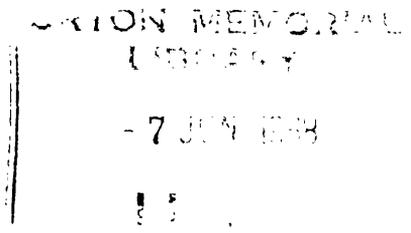


ESTUDIO SOBRE LA PATOGENESIS E HISTOLOGIA SINTOMATOLOGICA  
DE Fusarium oxysporum f. phaseoli EN EL  
FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.)

Por

Selma López Duque



Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA  
Centro de Enseñanza e Investigación  
Turrialba, Costa Rica  
Mayo, 1968

ESTUDIO SOBRE LA PATOGENESIS E HISTOLOGIA SINTOMATOLOGICA

DE Fusarium oxysporum f. phaseoli EN EL

FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.)

Tesis

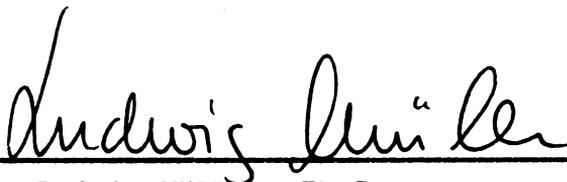
Sometida al Consejo de la Escuela para Graduados  
como requisito parcial para optar al grado de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA

APROBADA:



Ludwig Müller, Ph.D.

Consejero



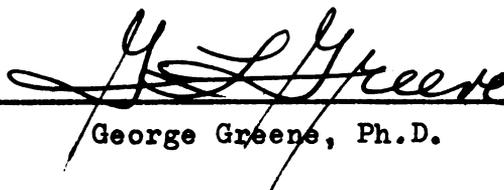
Hans Trojer, Ph.D.

Comité



Rodrigo Gámez, Ph.D.

Comité



George Greene, Ph.D.

Comité

Mayo, 1968

AGRADECIMIENTOS

La autora manifiesta su sincera gratitud al Dr. Ludwig Müller, por la acertada y activa participación en el presente trabajo y por todas las enseñanzas que de él recibió a través de esta investigación y en los cursos en los cuales fue su profesor.

Al Dr. Hans Trojer y señora por su constante apoyo durante su permanencia en Costa Rica.

A los Drs. Rodrigo Gámez y George Greene por el asesoramiento en este trabajo.

A la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, entidad que patrocinó sus estudios de postgrado.

BIOGRAFIA

La autora es de nacionalidad colombiana, realizó estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Caldas, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1965.

Desde la terminación de sus estudios ha trabajado para la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia en el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Chinchiná, Caldas).

Realizó sus estudios de postgrado en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, de setiembre de 1966 a mayo de 1968.

## CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION .....	1
REVISION DE LITERATURA .....	4
I. Penetración del hongo a la planta hospedera .	4
II. Anatomía de plantas enfermas .....	6
III. Causas de los síntomas de la enfermedad .....	8
IV. Bases de la resistencia y susceptibilidad ...	16
MATERIALES Y METODOS .....	19
I. Variedades de frijol .....	19
II. El hongo .....	21
III. Estudios anatómicos y morfológicos .....	24
A. Cortes a mano del tejido y separación de la epidermis .....	24
B. Cortes de material congelado .....	25
C. Preparaciones permanentes .....	27
D. Estudio de la corriente circulatoria ....	28
RESULTADOS .....	30
I. Penetración del hongo .....	30
A. Pruebas <u>in vitro</u> .....	30
B. En plántulas creciendo en suelo .....	31
II. Distribución del hongo en la planta y desa- rrollo de la infección .....	34
III. Anatomía de plantas enfermas .....	38
IV. Estudio de la corriente circulatoria .....	46
DISCUSION .....	49
CONCLUSIONES .....	55
RESUMEN .....	57
SUMMARY .....	59
LITERATURA CITADA .....	61

## LISTA DE CUADROS

Cuadro N <sup>o</sup>		Página
1	Métodos de inoculación con <u>F. oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> y su relación con la penetración y sintomatología de la enfermedad en plantas de frijol de variedades tolerantes y susceptibles .....	32
2	Porcentajes de reaislamientos de <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> de diferentes partes de plantas de frijol (variedades tolerantes y susceptibles al hongo) presentando síntomas característicos de "Fusariosis". Los datos se tomaron 15 días después de la inoculación .....	35
3	Tiempo (en minutos) de recorrido para que el colorante llegue de la raíz a las hojas basales en plantas de frijol (variedades tolerantes y susceptibles), afectadas por <u>F. oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> y presentando síntomas característicos de la "Fusariosis" ....	46
4	Porcentaje de vasos taponados en diferentes partes de plantas de frijol de variedades tolerantes y susceptibles afectadas por <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> .....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura No		Página
1	Micelio del hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> con clamidósporas en diferentes estados de su formación .....	22
2	Micelio del hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> con clamidósporas. Fotomicrografía con dispositivo de contraste de fases .....	22
3	Suspensión de microconidios del hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> .....	23
4	Dos macroconidios típicos y varios microconidios del hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> .....	23
5	Corte longitudinal de una tráquea de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.) mostrando en su interior hifas del hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Se ha indicado una célula adyacente penetrada por el hongo .....	37
6	Corte transversal de una tráquea de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.) en cuyo interior se aprecian hifas del hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Se ha marcado una traqueida obstruida por gomas .....	37
7	Corte longitudinal del xilema de un haz vascular del tallo de una planta de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.) susceptible al ataque de <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Puede notarse el depósito de gomas en varias tráqueas y traqueidas .....	41
8	Corte transversal del mismo tallo como en Figura 7. La apariencia negra de los vasos se debe al taponamiento por gomas .....	41
9	Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven con ramificación, de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.), variedad Méjico 17-B, que muestra marchitamiento debido a la infección por el hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Los vasos inactivados por el hongo están sombreados .....	42

Figura No		Página
10	Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.), variedad 45-B, que muestra amarillamiento debido a la infección con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Los vasos inactivados por el hongo están sombreados .....	43
11	Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.), variedad 106-B, que muestra enanismo debido a la infección con <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Los vasos inactivados por el hongo están sombreados .....	44
12	Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven de frijol ( <u>Phaseolus vulgaris</u> L.), variedad tolerante H-182-N, infectada con el hongo <u>Fusarium oxysporum</u> f. <u>phaseoli</u> . Los vasos inactivados por el hongo están sombreados .....	45

## INTRODUCCION

Una de las enfermedades serias del frijol (Phaseolus vulgaris L.) es causada por el hongo Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick y Snyder (40, 78). Esta enfermedad, que ha sido denominada de diferentes maneras, es conocida en Costa Rica como "Amarillamiento", habiéndose encontrado en este país plantaciones severamente afectadas por ella (20).

La enfermedad la mencionó por primera vez Harter (35) en 1929, con el nombre de "Amarillamiento". Posteriormente otros autores (2, 3, 12, 40) se han referido a ella como "Marchitamiento", "Pedregumbre seca", o simplemente "Fusariosis", a causa de los síntomas externos tan variados que se observan. Este hecho ha llamado poderosamente la atención y ha sido tema de confusión entre los diferentes investigadores que se han ocupado de su estudio. En frijol, las plantas infectadas no se marchitan de la manera característica como se marchitan otras plantas con ataques de otras especies de Fusarium, sino que hay en su lugar ligero amarillamiento y doblamiento de las hojas inferiores, que es seguido por el par inmediatamente superior de hojas en orden ascendente. Hay también decoloración completa de las hojas, enanismo y a veces defoliación.

Según investigaciones recientes (19), el síntoma que se presenta en la planta está relacionado en cierto modo con el color de la testa de la semilla. Así, las variedades de color blanco y bayo presentan amarillamiento intenso, en las de color negro hay fuerte marchitez sin pérdida de color y en las variegadas, defoliación.

La patogenicidad del hongo, ha sido demostrada en forma satisfactoria y es abundante la literatura sobre este tópico (2, 3, 19,

20, 40, 78). Pero no hay conocimiento como el patógeno penetra al hospedero y como causa la enfermedad; solamente hay conceptos y especulaciones al respecto.

En pruebas preliminares de resistencia con 103 variedades de frijol se encontró (19) que ninguna era resistente al patógeno, algunas variedades presentaban cierta tolerancia mientras que la mayoría mostró diferentes grados de susceptibilidad.

Se sabe también que el hongo produce una toxina, lo que se puede comprobar al cultivarlo en un medio artificial (19). Esta sustancia produce severa marchitez tanto en las plantas tolerantes como en las susceptibles, sin diferencia en la sintomatología.

Considerando que un mejor conocimiento acerca de las verdaderas relaciones parásito-hospedero ayudaría a comprender y explicar en la mejor forma el complejo anatómico-fisiológico responsable de los síntomas en las plantas afectadas, se efectuó el presente trabajo, el cual tuvo como objetivo principal, estudiar los aspectos siguientes:

1. Penetración del hongo al hospedero.
2. Distribución del hongo en plantas enfermas después de la penetración y su relación con el tejido susceptible del hospedero, de acuerdo al daño causado en el curso del desarrollo de las lesiones.
3. Correlación de síntomas internos y externos.
4. Determinar si las plantas tolerantes en comparación con las susceptibles muestran diferencias anatómicas que

puedan relacionarse con el avance del patógeno dentro de los tejidos del hospedero.

5. Determinar si hay o no formación de tílides, su papel en el desarrollo de la enfermedad y si éstas son o no responsables de la tolerancia de la planta al patógeno.

Por tanto, los resultados reportados aquí están íntimamente relacionados con la anatomía de la planta hospedera, particularmente con la del xilema. Así es indispensable revisar también, antes de proceder a explicar los resultados obtenidos, algunos conceptos básicos sobre anatomía, lo cual se hará en la revisión de literatura pertinente.

## REVISION DE LITERATURA

### I. Penetración del hongo a la planta hospedera

El conocimiento del proceso de penetración del parásito a la planta hospedera es muy importante para aclarar las verdaderas relaciones parásito-hospedero. Como se mencionó en el capítulo anterior, para el caso específico de la "Fusariosis" del frijol causada por Fusarium oxysporum f. phaseoli, no se han efectuado trabajos de esta índole, pero sí hay referencias de tales investigaciones realizadas con otras especies de Fusarium y otros géneros de patógenos que atacan al frijol.

Christou (16), en trabajos con patógenos radicales del frijol, encontró que Fusarium solani penetró más fácil y profundamente por los estomas o heridas en el hipocótilo, que a través de la rizodermis. Además, que en el hipocótilo el desarrollo del hongo era más vigoroso, lo cual permite concluir que en realidad este organismo es más un invasor del hipocótilo que de la raíz. Con Rhizoctonia solani el mismo autor (15) notó que la penetración podía ocurrir directamente por la cutícula del hipocótilo mediante hifas que surgen del crecimiento compacto que hace el hongo previamente en la epidermis, sin formar ninguna estructura apresorial; también penetra por los estomas mediante hifas que crecen en la superficie de la epidermis, siendo ésta la vía más común de entrada. Otra posibilidad la ofrecen heridas mecánicas, siendo en este caso similar la penetración a como ocurre por los estomas, pero con un mayor número de hifas. Christou (15) también observó penetración directa, o por

heridas, a través de la corteza de la raíz. Las hifas en la corteza radical no crecen tan profundamente y no son tan vigorosas como en el hipocótilo. Esto explica porque las lesiones producidas en las raíces son más pequeñas que las del hipocótilo y sugiere que la raíz es menos susceptible que el hipocótilo. El hongo Thielaviopsis basicola penetra profundamente en el lumen de las células epidermales de la raíz e hipocótilo (14) en forma directa sin la formación de un apresorio. Sin embargo aparecen estructuras especiales como estacas o clavijas a partir de las cuales pequeñas hifas constrictas crecen e invaden células epidermales y corticales intra e intercelularmente.

La penetración del F. oxysporum en diferentes hospederos ha sido muy estudiada y ampliamente discutida. En banano se sabe (73) que no ocurre por el pseudotallo o las hojas, pero sí por el rizoma o tallo verdadero. En las primeras referencias que se hicieron del "Mal de Panamá", Brandes (11) presentó evidencia de una penetración a través de tejidos intactos de las raíces principal o primarias, próxima al ápice radical. Sin embargo Wardlaw (73) fue incapaz de obtener penetración del hongo en raíces activas sanas de la misma planta, pero reportó infección tanto en raíces principales como raicillas laterales bajo condiciones desfavorables para su crecimiento activo y también después de una plasmólisis. Además, observó penetración del hongo dentro de raíces jóvenes cortadas cerca de su extremo. El mismo autor consideró como el medio más adecuado para la penetración heridas en la base de las raíces, junto con injurias de insectos al rizoma. Trabajos posteriores (60) demostraron que en

raíces de banano completamente sanas no hay penetración, lo que permite concluir que este patógeno en realidad no tiene habilidad para penetrar células vivas de la raíz principal.

En soya, la penetración del Fusarium es directa a través de las células epidermales o heridas resultantes del crecimiento de raíces secundarias, como también por el hipocótilo (26).

El Fusarium causante del amarillamiento del repollo penetra principalmente por la región de células embrionales, epidermis o células corticales de la raíz e hipocótilo joven; con frecuencia también penetra por los pelos radicales, según los trabajos realizados por Anderson (1) y Smith (63) en variedades de repollo resistentes y susceptibles.

Para F. conglutinans del aster (Aster marginatus) los puntos de penetración más frecuentes son la corteza y células epidermales de la región de elongación. En pocos casos se observó penetración directa (69).

## II. Anatomía de plantas enfermas

Al igual que en el caso de la penetración, para el F. oxysporum de frijol no existen estudios relacionados con la anatomía patológica de la planta. Se sabe que F. solani (16), después de la penetración, invade los tejidos de frijol intercelularmente pero el micelio queda restringido a la región cortical hasta la muerte de la planta hospedera. Sin embargo, Shaw-Ming (61) afirmó que este patógeno, además de causar pudrición cortical, producía discoloración vascular. El F. conglutinans (69) invade el xilema, cambium

y floema del aster con producción de gomas y presencia de color pardo o marrón. El mismo fenómeno ocurre con el Fusarium sp. de repollo (1) que, siendo parásito vascular, se encuentra también en el cambium, células parenquimáticas, corteza y en la zona comprendida entre la raíz e hipocótilo.

El F. oxysporum f. cubense en banano está confinado al xilema hasta que cesan las funciones normales de la planta. Cuando incrementa el marronamiento y al empezar la decadencia del tejido invade saprofiticamente células del parénquima adyacente a los vasos conductores (64, 68). Beckman (9) sugirió que la infección del xilema en la raíz está acompañada por movimientos de microconidios por la corriente vascular. Este movimiento de dispersión puede ser bastante amplio al no ser impedido por taponamiento en los extremos de los vasos. Trujillo (68) encontró que en las infecciones naturales de raíces, la producción de microconidios estuvo limitada a los vasos de la raíz debido a que los mecanismos de resistencia operativos en las raíces no permitieron un libre movimiento de estas esporas; así, la invasión del xilema del tallo la atribuyó principalmente al desarrollo de hifas.

La anatomía patológica de variedades de aster resistentes, intermedias y susceptibles al F. conglutinans se estudió con el fin de ver si en ellas existían diferencias de alguna índole responsables de la resistencia (69). Se encontró que en las plantas resistentes había poca extensión del foco de infección, pero el comportamiento del hongo y la reacción del hospedero a la invasión en las

resistentes no era distinguible de las plantas susceptibles e intermedias. No se observaron barreras estructurales que pudieran prevenir el avance del hongo, ni peculiaridades en las reacciones de tinción del tejido, las que pudieran indicar un antagonismo entre el contenido de la célula y el parásito. Con estos resultados se concluyó que la resistencia no parece estar conectada con ninguna estructura morfológica sino que probablemente está asociada con la naturaleza fisiológica del protoplasma.

En repollo se encontró (63) que la penetración de Fusarium sp. el desarrollo de la infección era igual en las plantas resistentes y susceptibles; sin embargo, lo que si se observó en forma más consistente fue una relación definida entre desarrollo de raíces secundarias y la resistencia.

### III. Causas de los síntomas de la enfermedad

Marchitamiento y marronamiento vascular son los síntomas promi nentes en el tipo de enfermedades causadas por las diferentes formas de Fusarium oxysporum en un gran número de hospederos. Para la explicación de estos síntomas se han sugerido diferentes teorías:

1) Taponamiento y obstrucciones traqueales; 2) Escasez de agua en los tejidos de la planta; 3) Liberación de toxinas que inhiben ciertas funciones de la planta tales como respiración; 4) En forma limitada, deformación o distorsión de los vasos. Son muchísimas las referencias que se conocen de estudios realizados para probar la verdadera causa de estos síntomas. Sin embargo, otros síntomas también frecuentes, tales como amarillamiento, clorosis, enanismo y

epinastia han sido menos estudiados y discutidos en las referencias bibliográficas.

La mayoría de las evidencias experimentales indican que el marchitamiento se debe principalmente al taponamiento de los elementos vasculares en toda la planta. Los términos "taponamiento vascular" y "oclusión" se han usado (36) para describir la disminución del flujo de la savia bruta en el xilema, fenómeno que se manifiesta externamente por marchitamiento foliar. La naturaleza del material que causa el taponamiento y que impide el movimiento del agua en el tallo infectado no se conoce bien. Pueden responsabilizarse geles, tálides, gomas, resinas u otras sustancias. De acuerdo con la literatura (13, 23, 29), gomas y tálides son muy comunes en plantas normales, pero la prevalencia de estas formaciones en plantas afectadas por diferentes patógenos, entre éstos varias formas de F. oxysporum, justifica que se resalte su presencia como síntoma de la enfermedad.

Así, Scheffer y Walker (59) explicaron el marchitamiento, causado por F. oxysporum f. lycopersici, como debido al taponamiento de vasos, resultado del desarrollo micelial del patógeno y producción de tálides de células adyacentes a los vasos y gomas, bien sea producidas por el patógeno o por el hospedero.

Bailey (5) informó que en el caso de infecciones de F. niveum en plantas de melón había abundancia de tálides lo cual parece estar correlacionado con la cantidad y proximidad del hongo a los haces vasculares infectados de la misma planta. Esto explicaría también satisfactoriamente el síntoma de marchitamiento a consecuencia

del taponamiento.

En banano, diferentes investigadores (8, 9, 73) han encontrado abundante producción de tílides y gomas en los vasos como resultado del ataque de F. oxysporum f. cubense. Wardlaw (73) y posteriormente Beckman (8, 9), han demostrado la importancia del gel y de las tílides, así como su multiplicación a partir de células adyacentes al parénquima. Tanto el gel como las tílides bloquean el avance del patógeno a lo largo de los vasos. Wardlaw (73) también probó que el parénquima adyacente al vaso infectado puede confinar al hongo y a su toxina dentro del mismo vaso.

En camote, McClure (46) observó tílides en el xilema de plantas enfermas. Tanto estas tílides como también la discoloración vascular estaban relacionadas con el avance del micelio a lo largo del tejido conductor.

French (26) observó en soya simultáneamente discoloración vascular y taponamiento de los vasos del xilema.

En diferentes especies forestales Struckmeyer (65) encontró que había taponamiento de los vasos del xilema con tílides y gomas. Este fenómeno precedió al marchitamiento del follaje debido más bien a insuficiente agua en la planta que a sustancias tóxicas. En oclusiones severas los vasos del xilema se obstruyeron completamente con la formación de tílides y gomas.

En lo referente a la explicación del síntoma de marchitamiento por escasez de agua o dificultad en el transporte de ésta a través de la planta Hursh (37) afirmó por primera vez que los filtrados de hongos pueden interferir con el funcionamiento normal del sistema

de conducción del agua en la planta. Pero él encontró que una marchitez en si no era realmente un adecuado criterio para explicar los característicos daños producidos por los hongos a los tejidos de las plantas. Varios factores influyen sobre la rapidez y el grado del marchitamiento tales como edad y condición del tallo, el tiempo y tratamientos aplicados a las plantas después de la infección, sustancias tóxicas que son llevadas en la corriente traqueal del tallo, etc., etc.

En arvejas (Pisum sativum) el marchitamiento causado por Fusarium sp. se ha explicado (43) no por deficiente transporte del agua, sino por una excesiva disminución del agua en las hojas, resultado de la baja potencia de retención de ésta por el protoplasma de las células foliares.

Estudios realizados por Page (50) indicaron que la disminución de la transpiración de plantas de banano, afectadas por F. oxysporum f. cubense, asociada con un volumen reducido de agua en los vasos, es parte del síndrome de la enfermedad "Mal de Panamá". Sin embargo, él sostuvo que el bloqueo de los vasos y la reducción del flujo de agua a través de vasos no funcionales por si solo no era el factor responsable de la aparición de síntomas, ya que en algunos casos había marcado amarillamiento que tampoco pudo resultar sólo de una disminución de la provisión de agua. El mismo autor (50) también de terminó pérdidas de peso en plantas enfermas en relación con sanas; tales pérdidas se debían a una mayor transpiración y al volumen de exudado traqueal acuoso.

Gottlieb (32) aseguró que el marchitamiento de tomate afectado

por F. oxysporum f. lycopersici estaba correlacionado con una toxina presente en el fluido traqueal del hospedero. Esta toxina incrementó la permeabilidad de las células de la planta hospedera, y cuando se redujo considerablemente la transpiración de las plantas tratadas con la toxina no ocurrió el marchitamiento.

En una atmósfera saturada de vapor de agua, condición bajo la cual no hubo transpiración, el marchitamiento fue también inducido (59) por medio de toxinas aisladas del micelio de varios hongos, demostrándose por lo tanto que el marchitamiento no estaba directamente ligado a la pérdida de agua. Cuando Scheffer y Walker (59) aplicaron una presión a tallos y pecíolo de plantas de tomate enfermas y sanas, menos agua fluyó a través del sistema vascular afectado que del normal.

Actualmente se reconoce que enzimas pécticas extracelulares producidas por las diferentes especies y formas de Fusarium en un número grande de plantas hospederas juegan quizá el papel más importante en la producción del síntoma de marchitamiento. En varios trabajos se han discutido las características de esas enzimas, su producción y su efecto sobre el hospedero; como se discutirá a continuación. El modo exacto de acción no es el suficientemente claro, aunque por los argumentos expuestos si se conoce su importancia en la inducción de los síntomas típicos de marchitamiento y amarillamiento.

Uno de los primeros en estudiar el efecto de sustancias tóxicas de filtrados del cultivo de Fusarium fue Rosen (57), quien obtuvo marchitamiento de plantas de algodón con filtrados del cultivo

de F. vasinfectum. Este autor concluyó que el marchitamiento y la discoloración interna eran debidos a sustancias tóxicas producidas por el hongo, pero no determinó su naturaleza química.

La teoría del traslado en la corriente circulatoria de toxinas producidas por el patógeno fue propuesta por Gäumann y colaboradores (27) quienes aislaron una toxina específica, el licomarasmin, del filtrado del cultivo del hongo F. oxysporum f. lycopersici. El licomarasmin fue identificado por Wolly (77), como un dipeptido de la asparagina. Más tarde Dimond y Waggener (17) también constataron la presencia de esta sustancia en tomate afectado por F. oxysporum f. lycopersici y adujeron que era producida por lisis. Page (53), en sus trabajos con F. oxysporum f. lycopersici, igualmente aisló el licomarasmin de plantas de tomate afectadas por el patógeno y lo identificó como un péptido. El también estudió su fisiología y probó que era un constituyente de la pared celular del F. oxysporum. Sin embargo, Gäumann (27) lo identificó como un polipéptido y lo responsabilizó como el principal causante del síntoma en tomate afectado por F. oxysporum. El mismo autor probó también que en el filtrado del hongo sustancias diferentes al licomarasmin ejercen efecto complementario. Posteriormente Scheffer (59) y Walker (72) demostraron que plántulas de tomate tratadas con el filtrado exhibían marchitamiento y marronamiento vascular, pero atribuyeron el efecto a otros factores presentes en el filtrado del cultivo. Una completa revisión sobre este tópico fue hecha por Gotoskar (30).<sup>4</sup>

Fue Park (54, 55) quien realizó un trabajo más amplio sobre la caracterización de la sustancia tóxica producida por Fusarium

oxysporum responsable del marchitamiento del tomate. El probó la actividad de sustancias producidas por 22 especies de hongos incluyendo ficomicetes, ascomicetes y hongos imperfectos, de los cuales 19 mostraron un comportamiento similar al del F. oxysporum.

En trabajos similares a los realizados con plantas de tomate afectadas por F. oxysporum f. lycopersici, Page (51) aisló ácido fú sárico de cultivos de F. oxysporum f. cubense y de rizomas de banana infectados con el mismo hongo. Gäumann (28) también aisló el mismo ácido, pero sugirió que éste no actuaba solo sobre la planta hospedera, sino que lo hacía acompañado de otras toxinas y sustancias.

En trabajos más recientes se encontraron e identificaron ciertas enzimas. Así Winstead (76), analizó el filtrado de varias especies de Fusarium de frijol, algodón, arvejas y tomate y detectó polimetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG). También observó que el marronamiento del tejido del hospedero era síntoma frecuente debido a los organismos que producen marchitez, sin que esté relacionado con la susceptibilidad respectiva del hospedero.

Subsecuentes estudios realizados por Gothoskar (30) revelaron la presencia de PME activa y PG en cultivos del hongo. Cuando se trataron vástagos de tomate con soluciones diluidas de PME se reprodujeron los síntomas típicos de la enfermedad. La conclusión de este trabajo fue que enzimas pécticas podrían producir síntomas de la enfermedad, pero el mecanismo de acción de inducir el marchitamiento no ha sido finalmente establecido. Waggoner y Dimond (71) obtuvieron posteriormente igual resultado que Gothoskar o sea que PME y PG

son producidas por el hongo F. oxysporum f. lycopersici.

Pierson (56) encontró en tomate síntomas semejantes provocados tanto por el hongo como por pectinasa comercial. A las 36 horas se observó completo taponamiento y a las 48 horas síntomas de marchitamiento cuando se cultivaba el hongo previamente sobre un medio con pectina pero no así sobre un medio solamente con glucosa. La PG es más activa sobre pectina en la presencia de PME y produce ácido galacturónico. Estos resultados fueron corroborados posteriormente por Gothoskar et al.(31).

Algunos progresos se han logrado en la detección de esterases, metilesterasas y fosfatasa mediante electroforesis en geles de almidón. Así, en investigaciones recientes, Meyer (49) detectó por medio de este procedimiento las tres sustancias en filtrados de ocho formas de F. oxysporum. Estas sustancias pueden jugar un papel importante en la especificidad del hospedero o en la patogenicidad. Determinaciones cuantitativas de la galacturonasa fueron hechas por Page (52).

Como se mencionó anteriormente, son pocas las referencias que se conocen sobre estudios que traten de explicar los síntomas del marchitamiento por efectos anatómicos.

Henrietta y Corden ( ) encontraron deformación y distorsión de vasos en tallos y pecíolos de todas las plantas de tomate infectadas con Fusarium. En casos severos las paredes opuestas de los vasos se ponían en contacto y de este modo redujeron considerablemente el lumen de los elementos conductores. Estos vasos deformados podían presentarse en varios o en todos los haces vasculares

del tallo. Los vasos deformados no contenían hifas. De este modo la deformación era probablemente causada por metabolitos del hongo o de la planta hospedera en respuesta al ataque fungoso. Esas sustancias fueron trasladadas más allá del patógeno y luego ejercieron sus efectos sobre el hospedero antes que otros síntomas de la enfermedad se hicieron evidentes.

Wardlaw (73) también observó deformación de vasos en el protoxilema y metaxilema en raíces de plantas de banano infectadas con F. oxysporum f. cubense. Tal deformación fue causada por expansión y proliferación de células parenquimáticas circundantes de los vasos dañados. El explicó estos cambios debido a un alto nivel y mayor actividad de las auxinas.

Finalmente, otro síntoma al cual se hace referencia, es la epinastia de las hojas. Al respecto Dimond y Waggoner (18) demostraron que el etileno era el agente responsable, además de causar al mismo tiempo síntomas de la enfermedad en la raíz. Pero el etileno no es responsable de la defoliación de las plantas enfermas.

#### IV. Bases de la resistencia y susceptibilidad

En la resistencia de diferentes hospederos al Fusarium sp. se citan (9, 74) como respuestas principales la producción de una barrera de parénquima fundamental la cual aísla el tejido dañado, la suberización de paredes celulares y la producción de gomas y tili-  
des en los vasos. Algunos mecanismos de resistencia operan por excluir el patógeno de las raíces y a menudo los tejidos corticales de las raíces imposibilitan las infecciones directas (42). Quizás

el aspecto de mayor importancia con respecto a la resistencia de las plantas a infecciones por Fusarium spp. es la producción de gomas y tálides. McClure (46) afirmó que la goma formada en las aberturas de las puntuaciones en la vecindad del patógeno pudo actuar física o químicamente como una barrera, la cual prevenía la penetración de hifas o de conidios del hongo desde células adyacentes.

Beckman y Halmos (8, 9) hicieron un ensayo para determinar si las diferencias en resistencia en banano estaban asociadas con diferencias en la capacidad de los tejidos vasculares para transportar esporas de Fusarium spp. Encontraron que efectivamente el traslado de las esporas dependía de las obstrucciones físicas en el tejido vascular. En trabajos posteriores (10) se insistió en que la resistencia al marchitamiento provocado por F. oxysporum en diferentes hospederos radicó en la rápida oclusión vascular debida a las gomas y tálides que se formaron y las cuales impidieron la distribución de las esporas del hongo dentro de plantas resistentes.

Sin embargo, un avance en el estudio del mecanismo de patogenicidad y resistencia de los hospederos al Fusarium son las investigaciones de la relación entre patogenicidad y enzimas como depolimerasas, endopoligalacturonasas y celulasas presentes en plantas enfermas. Estos estudios de las enzimas hidrolíticas pueden ser especialmente evaluados para aclarar dos problemas en el mecanismo de resistencia: el posible papel de la enzima en la penetración del hongo y la formación de enzimas después que las raíces se infectan. Basados en esto se efectuaron trabajos más detallados tanto por

Bateman (6) con R. solani en frijol, como por Edgington y Dimond (21) con Fusarium en tomate.

En trabajos más recientes con F. solani f. phaseoli la tendencia ha sido de tratar de correlacionar la presencia de estas enzimas con la resistencia de la planta. Se demostró que la mayor o menor producción de enzimas pécticas en la raíz o en el hipocótilo ayudó al desarrollo intercelular del patógeno dentro del hospedero.

Finalmente, la resistencia y susceptibilidad al Fusarium sp. han sido asociadas también con el estado nutricional de las plantas hospederas ya que por medio de aplicaciones de un determinado elemento o fertilizante se reduce la infección como es explicado por Littrerell (44) y Jones (39).

## MATERIALES Y METODOS

Los ensayos se efectuaron en el laboratorio e invernadero de Fitopatología del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, en Turrialba, Costa Rica.

### I. Variedades de frijol

Para realizar las pruebas, se seleccionaron diferentes variedades de frijol de un grupo de 103 variedades, pertenecientes a la colección del programa de Cultivos Alimenticios del IICA. Estas selecciones se basaron en los resultados de ensayos de invernadero realizados por Dongo (19) para determinar la resistencia al hongo. El criterio de selección empleado fue el siguiente: dentro de las variedades tolerantes se escogieron las de mejores características agronómicas; de las susceptibles se emplearon aquellas que presentaban síntomas de amarillamiento, marchitez y enanismo en su forma más característica, sin que en ellas hubiera manifestación de más de un síntoma a la vez. Los nombres de las variedades y el color de la testa de la semilla aparecen a continuación:

Variedades tolerantes (sin síntomas)	Variedades susceptibles		
	Enanismo	Marchitez	Amarillamiento
H-182-N (negro)	S-64-P(Pinto)	Mejico 17-B(bayo)	45-B(rojo)
32-Sel. antioquia C Sangretoro (rojo)	S-490-B(Bayo) 106-B (Bayo)	Guateman 6662-N (negro)	

Las plántulas utilizadas en cada caso provenían de semilla obtenida bajo las mejores condiciones de cultivo y libres de enfermedades y plagas. Para mejores resultados y una mayor uniformidad posterior, se colocaron las semillas seleccionadas y previamente de sinfectadas con hipoclorito de sodio (clorox) al 10%, en una cámara húmeda. Después de la germinación, todas las plantitas con longitud uniforme de más o menos 3 a 4 centímetros se sembraron en macetas de barro con suelo previamente esterilizado con bromuro de meti lo. Después se dejaron crecer en condiciones normales para ser ino culadas posteriormente. Por lo general, las plantas se utilizaron cuando tenían de 8 a 10 días de edad. En otros casos las plantitas se mantuvieron en una cámara húmeda con agua estéril o se cultivaron asepticamente en bolsas de polietileno conteniendo un medio a base de agar-agua-glucosa, hasta que las plantitas eran suficientemente grandes para servir en los experimentos sobre la penetración y estados tempranos de infección. Aunque diferentes métodos se pro baron, no fue posible encontrar otro medio de cultivo artificial que el descrito anteriormente, que fuera adecuado tanto para la planta como para el hongo y que se adaptara a las condiciones en que los ensayos fueron realizados. Usualmente se utilizaron plantas de tamaño y desarrollo lo más uniformes posibles y de éstas tan to las plantas a inocular como los controles fueron escogidos al azar.

## II. El hongo

Las cepas de Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick y Snyder utilizadas en este estudio fueron similares entre sí con respecto a características culturales y patogenicidad. Estas cepas habían sido aisladas e identificadas originalmente por Echandi (20) a partir de plantas de frijol afectado en el campo en Alajuela, Costa Rica y posteriormente probadas por Dongo (19) en ensayos de patogenicidad en invernadero.

El hongo se mantuvo en cultivo por trasposos sucesivos en un medio de frijol-glucosa-agar (FGA), preparado según indicaciones de Marthur (45) y la incubación se hizo a la temperatura del ambiente (21±2°C en promedio).

Para las inoculaciones se utilizaron colonias con buena producción de clamidósporas (Figuras 1 y 2), ya que se encontró (19) que eran más virulentas que los conidios solos. El inóculo se preparó agregando agua estéril al frasco de cultivo, agitándolo y pasando luego la suspensión a través de una tela de gasa doble. Como resultado la suspensión obtenida contenía en mayor proporción clamidósporas formadas a partir de conidios o de micelio y en menor cantidad micro y macroconidios (Figuras 3 y 4). Se procuró que la concentración de la suspensión estuviera siempre entre 1,5 a 2,0 millones de esporas por mililitro de agua.

En la mayoría de los casos se utilizó el método de inoculación propuesto por Wells (75). Consiste en cortar las dos terceras partes de las raíces, lavar la parte remanente en la planta con un

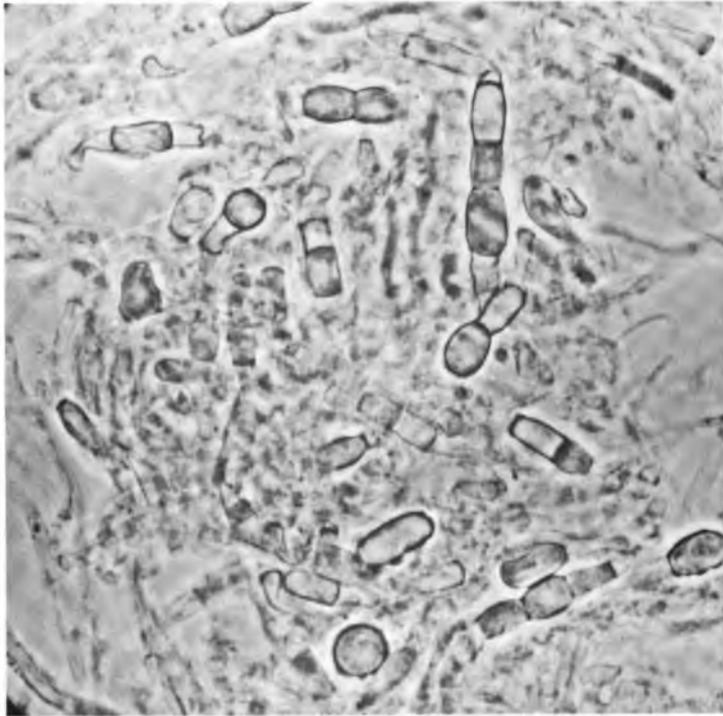


Figura 1. Micelio del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli con clamidósporas en diferentes estados de su formación.

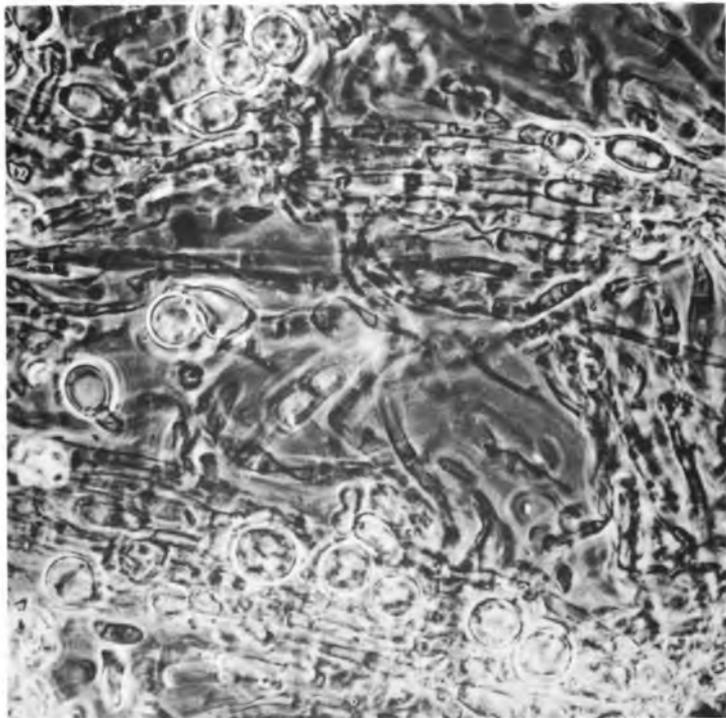


Figura 2. Micelio del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli con clamidósporas. Fotomicrografía con dispositivo de contraste de fases.

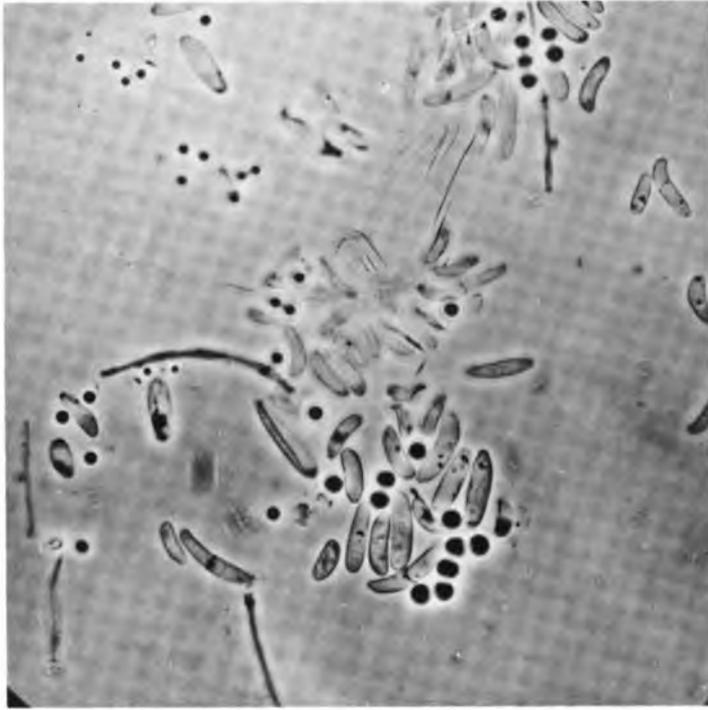


Figura 3. Suspensión de microconidios del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli.

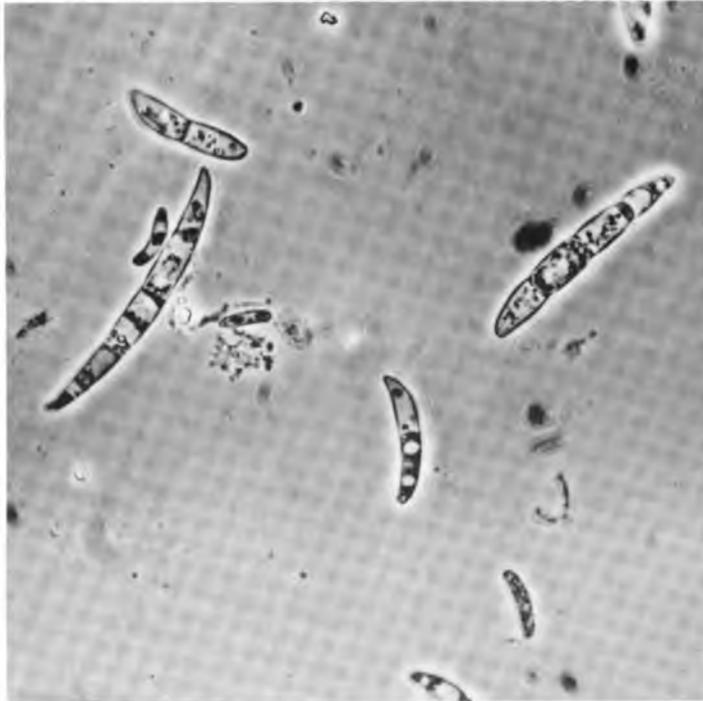


Figura 4. Dos macroconidios típicos y varios microconidios del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli.

chorro de agua fuerte y sumergir luego toda la base de la planta en la suspensión de las esporas del hongo. En pruebas específicas de penetración se ensayaron también otros métodos de inoculación, no usados anteriormente en trabajos con este hongo, los cuales se describirán más adelante.

Para los reaislamientos del hongo las partes afectadas se lavaron bien primeramente con jabón y luego con agua corriente por espacio de 8 a 12 horas. Después de dividir las en pequeños trozos, se sumergieron de 1 a 5 minutos en una suspensión de hipoclorito de calcio al 1%, realizando inmediatamente después las siembras en el medio papa-dextrosa-agar (PDA) acidificado con ácido láctico. La incubación se llevó a cabo a la temperatura del medio ambiente, con un promedio de 21,12°C (noviembre 1967 a febrero 1968).

### III. Estudios anatómicos y morfológicos

Se utilizaron diferentes métodos y técnicas para la preparación del material, siguiendo para este tipo de trabajo delineamientos generales descritos por Johansen (38), Gray (33, 34) y Sass (58). Además se emplearon técnicas específicas, establecidas para el hongo y hospedero, según trabajos similares realizados por otros autores (1, 14, 22, 41, 48, 63).

#### A. Cortes a mano del tejido y separación de la epidermis

Para observar la penetración in vitro, se utilizaron plantitas de frijol de 3 a 4 centímetros de longitud. Algunas de éstas se hicieron en la raíz, otras en el hipocótilo, o en ambos. A otras se

les cortaron las raíces parcialmente. Para fines comparativos se incluyeron para cada tratamiento testigos en forma de plántulas no heridas. La inoculación se hizo mediante suspensión de esporas, aplicada en gotas, o colocándoles pequeñas partes de la colonia del hongo sobre agar en diferentes sitios a la raíz e hipocótilo. Las plantas con las raíces cortadas se sumergieron en la suspensión. Después todas las plántulas se mantuvieron en una cámara húmeda.

A partir de las 12 horas hasta 4 días después, según el tipo de experimento, se procedió a efectuar las observaciones de la penetración. Para tal fin se separaron pedacitos de la epidermis del tejido inoculado y se hicieron cortes transversales a mano con la ayuda de una navaja. Para teñir el tejido se utilizaron diferentes colorantes y mezclas de ellos, siguiendo métodos descritos por diferentes autores: 1) Fucsina ácida al 1% en agua o en alcohol del 70% (14, 26); 2) Fucsina ácida en ácido láctico al 1% (14); 3) Verde brillante-floxina al 1 y 3% respectivamente, en alcohol etílico del 95% (47); 4) Floxina-verde rápido en aceite de clavos (70); 5) Safranina-azul de anilina, solución acuosa al 1 y 2% respectivamente (62); 6) Fucsina básica-ácido tánico, solución acuosa al 1% para el primero y al 10% para el segundo (62).

Después de la tinción los cortes de tejido se colocaron sobre un portaobjeto y se sellaron bien con lactofenol o bálsamo del Canadá al poner el cubreobjetos.

#### B. Cortes de material congelado

Para facilitar los trabajos anatómicos y poder observar un

mayor número de muestras se utilizó esta clase de cortes en preparaciones semipermanentes para el estudio de: a) Penetración y primeros estados de infección en material inoculado, como se describió en el punto anterior; b) Procesos avanzados de infección, bien en plantitas mantenidas in vitro o creciendo en macetas con suelo e inoculadas por el método descrito; c) Obstrucción de vasos en plantas creciendo en suelo, desde 48 horas después de la inoculación hasta el estado más avanzado de los síntomas; d) Avance de los síntomas internos a través de toda la planta (raíz hasta pecíolo).

Para facilitar el estudio del avance de los síntomas internos, después de la selección de la muestra se cortaron trozos pequeños de las partes que se querían observar. Sin tratamiento previo de fijación, se colocaron los trozos en solución acuosa de goma arábiga en un micrótopo de congelación con CO<sub>2</sub>, de la American Optical Company. Una vez congeladas, se seccionaron longitudinal o transversalmente y a un grosor variable según la consistencia del tejido muestras de: raicillas y pecíolos 50 μ; raíces secundarias 35 a 40 μ; tallos tiernos 35 μ; hipocótilos 25 μ y raíz principal de 20 a 25 μ. Una vez obtenida la cantidad conveniente de cortes, estos se depositaron en vidrios de reloj con agua. Luego se pasaron al colorante para su tinción para la cual se emplearon los colorantes y sistemas ya mencionados. En otros casos la tinción fue previa al corte para reducir el daño al tejido, usándose con tal fin fucsina ácida o floxina-verde rápido. Una vez teñidos los cortes, se colocaron en un portaobjeto en el medio de inmersión adecuado, como glicerina, antes de poner el cubreobjetos.

### C. Preparaciones permanentes

Se hicieron montajes permanentes de todo el material que se estudió para una observación más minuciosa y detallada del proceso de penetración del hongo, primeros estados de infección, desarrollo de hongo dentro del tejido, efecto de la infección sobre la anatomía de las plantas, etc.

Cada parte seleccionada, representativa del proceso o estado que se quería estudiar, se fraccionó en partes más pequeñas para facilitar la preparación de toda la zona que se quería observar.

En esta clase de preparaciones se combinaron los métodos descritos por varios autores (33, 34, 38, 58). Para matar y fijar el tejido se usaron como soluciones: a) Crafi I (ácido crómico-ácido acético-formalina) para raicillas y raíces recién emergidas; b) Crafi III para raíces secundarias, peciolo, hipocótilos y tallos tiernos; c) FAA (formalina-ácido acético-alcohol etílico) para raíces principales, hipocótilos y tallos bien desarrollados. La penetración de las sustancias para fijar en las muestras se facilitó por medio de la extracción del aire del tejido. Después de una fijación de 24 a 48 horas, se procedió a deshidratar mediante una serie de ocho soluciones de concentración ascendente de butanol terciario con etanol y agua, con proporciones desde 10-50-40 a 100-0-0. Para infiltrar se usó primeramente una parafina de punto de fusión de 56°C y luego "Paraplast"\*. El material infiltrado se

---

\* Marca depositada de la casa Fisher Cientific para una parafina mejorada.

montó en bloques de madera y se cortó en un micrótopo rotativo. El grosor de los cortes varió según la clase de material y fue de 10  $\mu$  a 20  $\mu$ .

Los cortes se fijaron al portaobjetos con el adhesivo de Mayer\* y se dejaron secar en una estufa a 40°C por 72 horas. Una vez endurecidas las placas, se procedió a la tinción con safranina en solución acuosa al 1%, contrastada con verde rápido en alcohol etílico del 95%. También se usó el verde rápido en solución al 1% en una mezcla de dos partes de etanol de 95% y una parte de aceite de clavos, enjuagando luego las placas en este mismo aceite. Finalmente se sellaron las preparaciones con resina sintética disuelta en xilol y cubreobjetos.

De cada muestra se hicieron 10 preparaciones de cortes diferentes, con no menos de 6 cortes en cada placa.

#### D. Estudio de la corriente circulatoria

Con el fin de observar las reacciones vasculares de plantas enfermas, se escogieron plantas de las 8 variedades en diferentes estados de manifestación de los síntomas de la enfermedad. Se efectuaron bajo agua cortes del extremo de la raíz o de la base del tallo. Así preparadas las plantas, se colocaron en soluciones de eosina o de azul de metileno al 1%. Se dejaron en condiciones favorables a la transpiración hasta que el colorante hubiera penetrado

---

\* Albumin Fixative Mayer de Chemical Harleco Products.

hasta las hojas. Después se subdividió el material en trocitos los cuales se sumergieron por un minuto en solución de ácido nítrico al 15%. Luego se lavaron en agua corriente por 10 minutos y se dejaron dentro de agua por 12 horas. Después de este tratamiento se pudo fácilmente separar la epidermis y corteza, permitiendo así la observación del xilema teñido y la evaluación del daño en éste. También se determinó el transporte de los colorantes en el sistema vascular por observaciones microscópicas de material fresco, cortado con el micrótopo de congelación. Para esto se hicieron cortes transversales de diferentes zonas de la raíz, tallo y pecíolo procurando que ellos no fueran sucesivos. En total se estudiaron siempre 10 cortes diferentes de una misma región. En cada corte se seleccionó al azar un determinado sector del tejido vascular. Las observaciones consistieron en contar el número total de vasos y el número de los vasos obstruidos, para así obtener el porcentaje de obstrucción.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio se presentan a continuación, según los diferentes aspectos investigados.

### I. Penetración del hongo

#### A. Pruebas in vitro

Se estudió la penetración del hongo en plántulas cultivadas in vitro de todas las ocho variedades de frijol. Después de la inoculación, las esporas del hongo emitieron de 1 a 2 tubos germinativos sobre la epidermis de la raíz o hipocótilo en un período de 12 a 24 horas. A continuación de la germinación de las esporas, hubo desarrollo de hifas en todas las direcciones, transversal y oblicuamente. Se notó una marcada diferencia con respecto a longitud, cantidad y desarrollo de las hifas entre inoculación de superficies heridas e intactas. En las heridas las hifas se compactaron un poco y se observó penetración de la epidermis sin previa formación de estroma ni de ninguna otra estructura. Tampoco hubo ninguna respuesta de defensa por parte del hospedero, como formación o transformación de algún tejido. La formación de hifas y la penetración ocurrieron entre las 24 y 36 horas posteriores a la inoculación, sin diferencia entre las plantas de variedades tolerantes y susceptibles. A pesar de que gran cantidad de hifas crecieron por encima de los estomas del hipocótilo, no se observó penetración a través de ellos.

Para comprobar si ocurría penetración por la radícula, zona

pilífera y raicillas muy tiernas, se inocularon estos órganos en plántulas provenientes de semillas de las variedades: H-182-N, 45-B, Guateian 6662 y S-64-P en diferentes estados de desarrollo de la raíz principal. Para la inoculación se colocaron gotas de la suspensión de esporas o pequeñas partes de la colonia del hongo sobre agar en los sitios respectivos, tanto en tejido herido como sin herir. Las plantas inoculadas se dejaron 48 horas en cámara húmeda y luego parte de ellas se sembró en macetas con suelo para observar la aparición de síntomas mientras que con la otra parte se hicieron pruebas de reaislamiento del hongo.

Los resultados fueron los siguientes: cuando se hicieron siembras de tejido de las plántulas en medio de cultivo no se reaisló el hongo en ninguno de los casos. Las plantitas que se sembraron en suelo no presentaron síntomas y se desarrollaron normalmente a pesar de que cuando las raicillas se hirieron había ligera necrosis a las 48 horas. En muchos casos las heridas estimularon la salida de nuevas raíces y cuando las plántulas se desenterraron, no se observó ninguna anormalidad patológica en la raíz.

#### B. En plántulas creciendo en suelo

Con el fin de observar en condiciones más naturales la forma y el sitio por donde ocurre la penetración del hongo, se ensayaron, además del método usual de inoculación ya descrito, otros 8 métodos. Como se aprecia en el Cuadro 1, estas formas especiales de inoculación abarcaron tanto los distintos tipos de raíces como el hipocótilo. Consistieron en sumersión de las raíces en solución de

Cuadro 1. Métodos de inoculación con F. oxysporum f. phaseoli y su relación con la penetración y sintomatología de la enfermedad en plantas de frijol de variedades tolerantes y susceptibles.

Método de inoculación	Variedades tolerantes				Variedades susceptibles					
	H-182-N		antioquia C 32 Sel. sangreoro		Méjico 17-B		45-B		S-64-P	
	Pene- tra- ción	% Plan- tas con síntomas	Pene- tra- ción	% Plan- tas con síntomas	Pene- tra- ción	% Plan- tas con síntomas	Pene- tra- ción	% Plan- tas con síntomas	Pene- tra- ción	% Plan- tas con síntomas
Método corriente	si	0	si	0	si	100	si	100	si	100
Cortando raíz, sin sumer- gir el hipocótilo	si	0	si	0	si	100	si	100	si	100
Sin cortar ni herir, sumer- giendo raíz e hipocótilo	no	0	no	0	no	0	no	0	no	0
Sin cortar ni herir, sólo sumergiendo la raíz	no	0	no	0	no	0	no	0	no	0
Raíz principal con heridas, sumergiendo toda la raíz	si	0	si	0	si	80	si	87	si	65
Hipocótilo sin herir, colo- cándole cultivo del hongo	no	0	no	0	no	0	no	0	no	0
Hipocótilo con heridas de punción colocándole culti- vo del hongo	si	0	no	0	si	18	si	24	no	0
Raíces laterales con he- ridas, sumergiendo todas las raíces	no	0	no	0	si	28	si	12	no	0
Colocando cultivo del hongo en raicillas	no	0	no	0	no	0	no	0	no	0

esporas o aplicación de cultivo del hongo en los mismos órganos sanos. Además se infringieron heridas en las raíces por doblamiento y punción con aguja; pero en el hipocótilo se limitó la herida a la punción.

También pueden verse en el Cuadro 1 las relaciones entre penetración y porcentaje de infección. Este último se determinó cuando las plantas presentaron síntomas típicos de la enfermedad, o sea después de unos 15 días. Para este ensayo se utilizaron dos macetas con tres plantas cada una por cada variedad.

Los resultados del Cuadro 1, indican que el hongo no penetra directamente en la raíz, ni por los estomas del hipocótilo sino que requiere de heridas profundas para ello. Tal requerimiento lo demostraron claramente las diferencias obtenidas en los porcentajes de plantas con síntomas. Así entre las plantas de variedades susceptibles hubo un 100% de penetración y exhibición de síntomas de infección al inocular raíces con heridas. Sin embargo, al aplicar los mismos tratamientos pero en los órganos sanos, no aparecieron síntomas.

Los porcentajes más bajos de infección (18 y 12%) los mostraron las variedades Méjico 17-B y 45-B al inocular el hipocótilo o punzando las raíces laterales con heridas, respectivamente.

Las plantas de las variedades tolerantes en ningún caso exhibieron síntomas aunque hubo penetración con algunas formas de inoculación.

## II. Distribución del hongo en la planta y desarrollo de la infección

La penetración del hongo en la planta hospedera se comprobó por medio de reaislamientos de éste de plantas con síntomas. Tales reaislamientos se hicieron de la raíz, hipocótilo y diferentes alturas del tallo y del peciolo de plantas de variedades tolerantes y susceptibles a partir de las 48 horas de la inoculación hasta 15 días después, cuando ya se presentaban los síntomas típicos de la enfermedad.

Fue posible observar que antes de 5 días después de la inoculación era imposible reaislar el hongo de las raíces, cuello de raíz e hipocótilo. En el Cuadro 2 se presentan los datos de reaislamientos para plantas con síntomas típicos de la enfermedad, cuando ya habían pasado más de 15 días.

Como puede observarse, el porcentaje de reaislamientos en la variedad tolerante era ya muy bajo en el hipocótilo (8%) y no era posible aislar el hongo del vástago. En las variedades susceptibles, sin embargo, fue posible obtener pruebas de la presencia del hongo hasta en el epicótilo, sin que el patógeno llegara hasta la primera hoja.

Mediante observaciones de material en preparaciones semi-permanentes y fijadas de secciones longitudinales y transversales, se constató la presencia de micelio creciendo a lo largo del tejido vascular e hipocótilo, tanto en plantas tolerantes como susceptibles.

Cuadro 2. Porcentajes de reaslamientos de Fusarium oxysporum f. phaseoli de diferentes partes de plantas de frijol (variedades tolerantes y susceptibles al hongo) presentando síntomas característicos de "Fusariosis". Los datos se tomaron 15 días después de la inoculación.

Parte de la planta	Variedad tolerante	Variedades susceptibles		
	32 Sel. antioquia C sangretoro	Guateman 6662	45-B	S-490-B
Raíz principal	80	96	89	86
Raicillas	0	12	18	6
Cuello de la raíz	50	94	87	87
Hipocótilo	8	86	92	82
Parte baja del tallo (epicótilo)	0	12	6	0
Nudo correspondiente a las primeras hojas	0	0	0	0
Pecíolo de hoja con síntomas	0	0	0	0

En general fue difícil reconocer la presencia del micelio dentro del tejido del hospedero por deficiencias en la tinción selectiva lo que resultó en falta de contraste entre el micelio del hongo y el tejido de la planta. Así era preciso hacer observaciones muy minuciosas, las cuales efectivamente revelaron que el hongo estaba confinado a los elementos del xilema. Se observaron hifas bien desarrolladas, creciendo sin interrupción por distancias relativamente grandes dentro de los vasos del xilema, principalmente traqueas.

Además se observaron microconidios dentro de los mismos vasos, los que aparecían completamente normales en su estructura. Esto se puede apreciar muy bien en las Figuras 5 y 6 en las cuales se distinguen claramente las hifas creciendo en el interior de los vasos. Puede notarse en la Figura 5 que a veces el micelio del hongo penetra por las punteaduras del vaso a las células adyacentes, fenómeno que ocurre en estado avanzado de la infección.

En raicillas laterales se pudo notar bien que el meristema apical no es invadido; pero la invasión del hongo puede iniciarse tan pronto como empieza el tejido vascular a diferenciarse (Figura 9, p. 42).

El desarrollo de la infección ocurre rápidamente, ya que poco después de la penetración se empieza a observar invasión del sistema vascular y hay ligero amarillamiento dentro de los vasos y posteriormente, con el avance del hongo, marronamiento y taponamiento de éstos. En un mismo haz pueden verse a la vez vasos taponados y vasos ocupados por el micelio (Figura 6), pero sin que éste se compacte y obstruya por completo el vaso. Con el avance de la infección a lo largo de la planta los elementos traqueales se deterioran completamente y llegan a inutilizarse. El resto de los tejidos del hospedero aparece completamente sano. En el transcurso de una infección fuerte las paredes de los vasos terminan necrosándose.

Cuando la infección es incipiente, se observa el marronamiento en el sistema vascular, pero no se llega a aislar el hongo de dichas partes en la mayoría de los casos. Posteriormente si puede aislarse en la raíz e hipocótilo y las partes más bajas del tallo



Figura 5. Corte longitudinal de una tráquea de frijol (Phaseolus vulgaris L.) mostrando en su interior hifas del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli. Se ha indicado una célula adyacente penetrada por el hongo.



Figura 6. Corte transversal de una tráquea de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en cuyo interior se aprecia desarrollo del hongo Fusarium oxysporum f. phaseoli. Se ha marcado una traqueida obstruida por gomas.

únicamente, a pesar de que la discoloración puede avanzar hasta los pecíolos de las primeras hojas.

Las plantas tolerantes mostraron más o menos el mismo grado de infección que las susceptibles con respecto a la extensión del patógeno en sus tejidos vasculares. No se encontraron cambios anatómicos como formación de tílides, que permitieran una distinción entre los dos grupos de plantas. La diferencia del comportamiento de las plantas susceptibles y tolerantes radicó principalmente en la intensidad de la manifestación de los síntomas secundarios internos tales como discoloramiento, marronamiento y obstrucción vascular.

### III. Anatomía de plantas enfermas

Se efectuaron observaciones detalladas de la anatomía de la raíz, hipocótilo, tallo, pecíolo y hojas de plantas tolerantes y susceptibles afectadas por el Fusarium oxysporum f. phaseoli en comparación con plantas sanas de las mismas variedades. Se observó que el hongo no indujo hipertrofias o deformaciones de las células o tejidos. Al igual que en la penetración, no hubo formación de barreras estructurales por parte de las plantas tolerantes que puedan prevenir o impedir el avance del hongo dentro del tejido. En forma similar se comportaron las plantas con diferente grado de susceptibilidad.

Uno de los síntomas más típicos de las plantas afectadas por el F. oxysporum f. phaseoli es el marronamiento del sistema vascular que ocurre en mayor o menor extensión según la susceptibilidad

de la variedad al patógeno. Las paredes de los vasos invadidos se tornan amarillo-marrón y con frecuencia se tñen fuertemente con safrina debido a la presencia de polisacáridos. Cortes de material fresco sin teñir, provenientes de plantas muy afectadas, mostraban el sistema vascular de un color pardo o marrón-oscuro, dando la apariencia de una estría marrón en medio de los demás tejidos blancos. Esta discoloración es menos pronunciada mientras mayor sea la distancia del punto de penetración del hongo. Con respecto a este síntoma, si hubo diferencia marcada entre las plantas de variedades tolerantes y susceptibles, de acuerdo al tipo de síntoma externo presentado. En las que se marchitan la discoloración fue intenso y alcanzó la altura del peciolo de las mismas hojas. Menor intensidad se observó en las que presentan amarillamiento, llegando el marronamiento a la parte basal del tallo. Había poca discoloración en las que mostraban enanismo, llegando ésta también al tallo (epicótilo). En cuanto a las tolerantes el marronamiento no avanzó mucho más allá del daño local o sea de la zona de la penetración del hongo en la planta. Así este síntoma se observó principalmente en las raíces, llegando en caso de infecciones del hipocótilo a lo sumo hasta la parte baja del tallo, o sea el epicótilo.

Simultáneamente con el síntoma de marronamiento se presenta taponamiento a los vasos de xilema por deposición de material, casi siempre en forma de masas esféricas. Estas deposiciones tienen un color amarillo o pardo en material fresco, sin teñir, pero teñidas con safrina son de color rojo intenso. En cortes longitudinales se ve que este material gomoso llena los vasos por distancias conside-

rables; estas sustancias pueden ocurrir también en el parénquima y en fibras adyacentes a los vasos afectados. En estados avanzados hay compactación de estas gomas lo cual puede observarse en las Figuras 7 y 8.

De acuerdo a las descripciones dadas por diferentes autores (13, 23, 24, 65), la forma de la deposición, tipo de tinción y la falta de núcleos en dicho material indican claramente que no se trata de verdaderos tálides sino de un gel o material gomoso.

Las hifas del hongo se encuentran en los vasos pero no se observa que ocurre obstrucción de dichos vasos por masas grandes de micelio.

Con respecto a la intensidad del taponamiento y avance de éste en la red vascular, si hubo diferencias bien marcadas entre las plantas de las variedades tolerantes y susceptibles, tal como se aprecia en las Figuras 9 a 12.

La variedad de frijol muy susceptible (Méjico 17-B) muestra inactivación por depósito de gomas en un gran número de vasos (Figura 9), tanto tráqueas como traqueidas. Como se aprecia quedan apenas pocos vasos que todavía sirven para la conducción de la savia bruta. Las plantas que muestran síntomas en forma de amarillamiento de las hojas inferiores (Figura 10) también tienen un número elevado de vasos taponados en las raíces jóvenes. Sin embargo, hay apenas pocos vasos, especialmente tráqueas, obstruidos por gomas, en las plantas que exhiben enanismo (Figura 11) y en las tolerantes (Figura 12).



Figura 7. Corte longitudinal del xilema de un haz vascular del tallo de una planta de frijol (Phaseolus vulgaris L.) susceptible al ataque de Fusarium oxysporum f. phaseoli. Puede notarse el depósito de gomas en varias tráqueas y traqueidas.

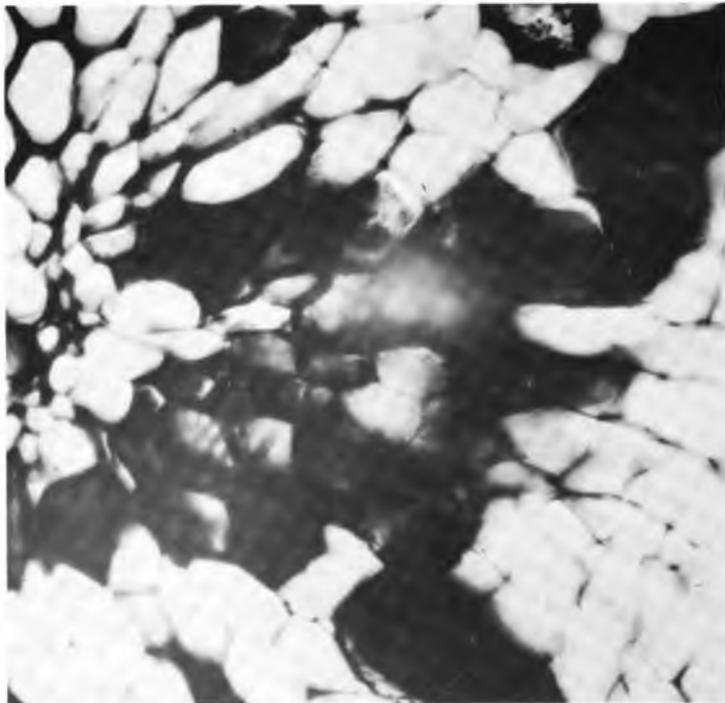


Figura 8. Corte transversal del mismo tallo como en Figura 7. La apariencia negra de los vasos se debe al taponamiento por gomas.

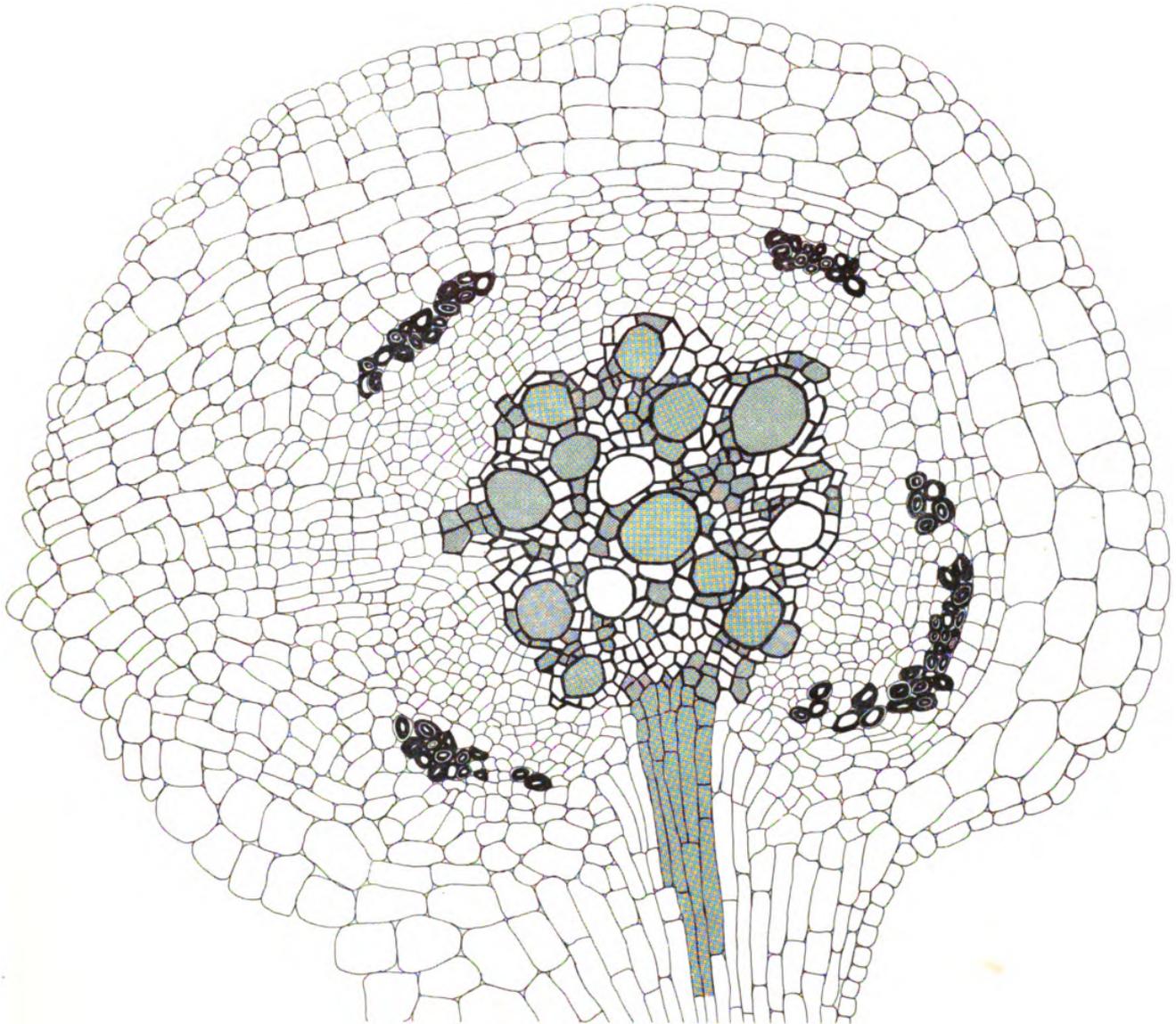


Figura 9. Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven con ramificación de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), variedad Méjico 17-B, que muestra marchitamiento debido a la infección por el hongo *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli*. Los vasos inactivados por el hongo están sombreados.

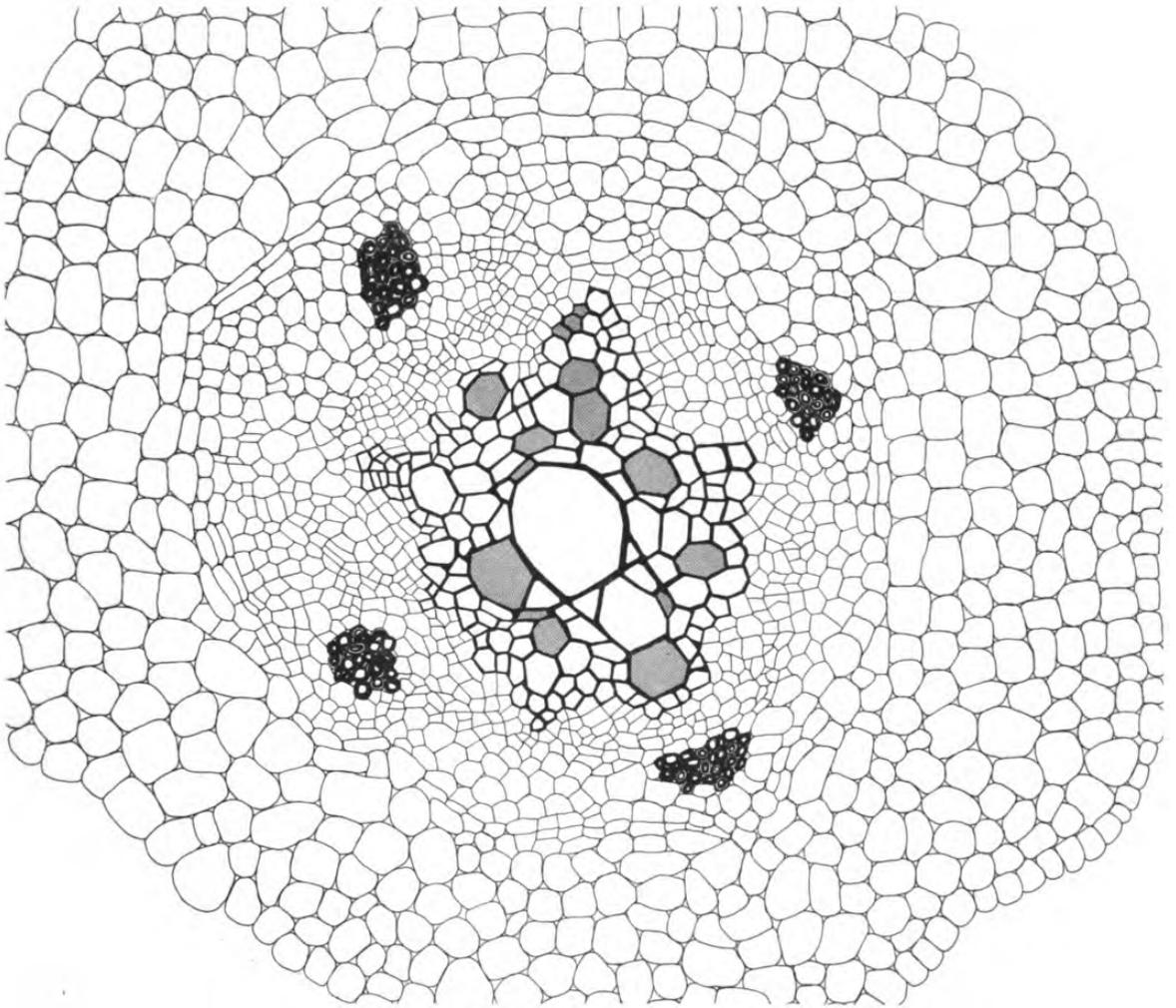


Figura 11. Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven de frijol (Phaseolus vulgaris L.), variedad 106-B, que muestra enanismo debido a la infección con Fusarium oxysporum f. phaseoli. Los vasos inactivados por el hongo están sombreados.

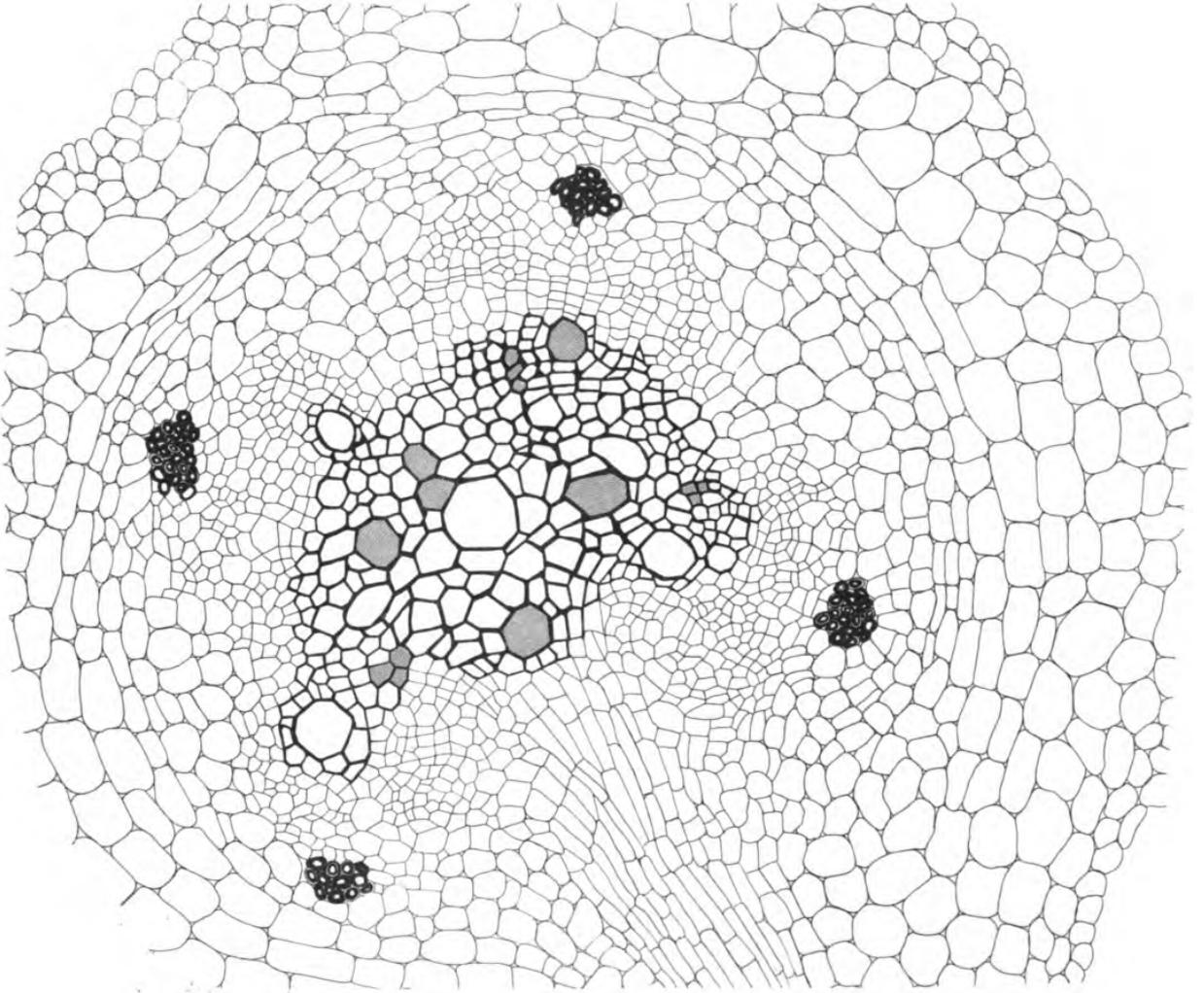


Figura 12. Dibujo esquemático de un corte transversal de una raíz joven de frijol (Phaseolus vulgaris L.), variedad tolerante H-182-N, infectada con Fusarium oxysporum f. phaseoli. Los vasos inactivados por el hongo están sombreados.

La cantidad de material depositado disminuye en todas las plantas con la altura en el tallo y está correlacionada con la intensidad del marronamiento. Así en las plantas con marchitamiento puede llegar hasta los pecíolos de las primeras hojas en las de amarillamiento y enanismo hasta el epicótilo.

#### IV. Estudio de la corriente circulatoria

Tanto en plantas tolerantes como susceptibles, hasta 8 días después de la inoculación, cuando aún no se habían presentado síntomas externos de la enfermedad, no hubo diferencia significativa en el transporte de colorantes a través de la red vascular. Tanto la eosina como el azul de anilina se difundieron casi con la misma velocidad y no fue muy notoria la diferencia en tonalidad de los vasos del xilema.

Cuando las plantas presentaban ya síntomas típicos de la enfermedad, sí se observaron diferencias en el tiempo requerido para que los colorantes fueran transportados sobre la raíz hasta las hojas como se aprecia en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tiempo (en minutos) de recorrido para que el colorante llegue de la raíz a las hojas basales en plantas de frijol (variedades tolerantes y susceptibles) afectadas por F. oxysporum f. phaseoli y presentando síntomas características de la "Fusariosis".

	Variedad tolerante	Variedades susceptibles		
	H-182-N	Méjico 17-B	45-B	106-B
Eosina	20	120	60 a 90	50 a 60
Azul de anilina	15	90	60	30 a 50

De cada planta se hicieron múltiples cortes a partir del extremo de la raíz a través del hipocótilo, tallo y pecíolos. Mediante la observación microscópica se constató que muchos vasos no conducían el colorante y que los pecíolos de las hojas completamente marchitas estaban libres de los colorantes. Esto se debió a la obstrucción en las partes más bajas, o sea hipocótilo y comienzos del tallo.

Para determinar si era taponamiento o decrecimiento en la transpiración se hizo el examen microscópico, el cual mostró taponamiento en correlación directa con la severidad de la enfermedad. Esto se puede observar claramente en el Cuadro 4 donde aparecen los porcentajes de vasos inutilizados en las diferentes partes de plantas de variedades tolerantes y susceptibles a las "Fusariosis". Como puede notarse, en algunos casos hubo grandes diferencias en los porcentajes de vasos inutilizados en los diferentes cortes dentro de cada parte de la planta. Pero en todos los casos el porcentaje promedio fue casi igual para raíz, epicótilo, tallo y pecíolo. La pequeña diferencia encontrada por plántulas se debe a que no todos los vasos de los haces conductores que salen de la raíz se extienden hasta el pecíolo.

Cuadro 4. Porcentaje de vasos taponados en diferentes partes de plantas de frijol de variedades tolerantes y susceptibles afectadas por Fusarium oxysporum f. phaseoli.

Partes de las plantas	C O R T E S										% Promedio de todos los órganos	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
	MARCHITAMIENTO (MEJICO 17-B)											
Rafz	100,00	80,00	87,50	70,83	78,57	70,37	82,61	95,34	61,10	80,76	80,70	79
Epicótilo	90,47	67,85	90,90	73,33	67,85	72,22	64,00	80,55	86,95	78,84	77,30	
Tallo	86,95	97,05	88,88	87,87	82,00	61,29	60,86	84,67	93,33	60,00	80,29	
Pecfolo	68,42	71,11	77,78	85,51	80,95	66,66	92,22	77,61	91,24	69,56	78,10	
	AMARILLAMIENTO (45-B)											
Rafz	70,00	64,71	56,67	79,31	58,25	47,56	76,47	62,50	77,22	77,77	66,55	67
Epicótilo	69,44	67,74	63,63	46,42	75,75	55,55	78,04	61,35	82,35	75,51	67,59	
Tallo	85,11	82,25	62,16	67,44	47,36	78,54	66,67	50,00	88,89	43,47	67,19	
Pecfolo	75,75	70,00	53,33	70,37	62,50	39,13	64,28	78,94	69,44	78,57	66,23	
	ENANISMO (106-B)											
Rafz	30,00	37,72	45,83	26,08	41,89	38,77	28,12	52,56	60,00	74,14	43,51	43
Epicótilo	67,24	31,57	54,34	57,14	30,43	46,15	31,22	25,00	33,33	52,61	42,90	
Tallo	42,42	63,63	42,85	32,14	30,00	38,29	52,63	32,14	47,05	40,98	44,21	
Pecfolo	22,45	25,00	33,33	76,59	62,00	23,8	30,43	25,92	65,15	40,80	40,55	
	TOLERANTE (H-182-N)											
Rafz	15,71	38,33	30,76	14,44	18,86	17,18	36,00	26,08	15,51	19,12	23,19	25
Epicótilo	35,29	23,72	39,58	26,31	10,71	22,72	37,03	20,67	25,49	33,33	27,48	
Tallo	32,35	15,90	22,22	29,16	43,13	15,15	19,51	15,38	18,42	25,71	23,69	
Pecfolo	36,84	20,00	30,26	22,72	19,44	36,66	22,22	18,75	22,72	28,57	25,72	

## DISCUSION

Los resultados obtenidos permiten aclarar las relaciones parásito-hospedero en tres de sus fases: 1) Penetración; 2) Desarrollo interno del patógeno en el tejido vascular en el transcurso de la enfermedad; 3) Dilucidar, por lo menos en parte las causas de los síntomas en las plantas y su implicación en la tolerancia al patógeno.

Los estudios de penetración del hongo demuestran claramente, que no hay penetración directa del susceptible, sino que el patógeno requiere de heridas profundas que expongan el tejido vascular; prueba de ello fueron los resultados obtenidos con la técnica de inoculación con corte de las raíces. En esta forma, el hongo queda en contacto directo con los elementos del xilema, en el cual luego tiene un rápido desarrollo tal como ocurre también con Fusarium oxysporum f. cubense en banano (60). Lesiones superficiales y aberturas naturales del tejido no son importantes en el proceso de penetración. Por lo tanto los estomas del hipocótilo no son la vía de entrada regular del patógeno, como ocurre con otros parásitos radicales del frijol (14, 15, 16). Esto quedó perfectamente comprobado al inocular el hipocótilo con la colocación de cultivo del hongo sobre tejido sano. Tampoco hay penetración del hongo por la radícula, raicillas y zona pilífera. Parece que cuando las plántulas de frijol son muy jóvenes, o sea se encuentran en su primera fase de desarrollo, hay poca probabilidad de una infección, la cual se hace más frecuente con el avance en edad. Al respecto...

Taylor y Parquinson (66) encontraron que el F. oxysporum en frijol es más abundante en las raíces de plantas en pleno desarrollo, pero a mayor edad de la planta hay menos probabilidades de recuperar el hongo, cuando se hacen aislamientos.

Al igual que Rhizoctonia solani y Fusarium solani, el F. oxysporum f. phaseoli no está limitado a un patrón definido de penetración e invasión pues no hay formación de apresorios, haustorios ni de ninguna otra estructura específica similar pero a diferencia de ellos no puede establecerse si todas las infecciones se originan en la raíz o en el hipocótilo y si la raíz es más o menos susceptible que el hipocótilo a la penetración. Circunstancias, tales como la distribución accidental de heridas que lleguen hasta el tejido vascular, contribuyen a la penetración y por lo tanto no hay posibilidad de diferenciar susceptibilidad de raíces de susceptibilidad del hipocótilo en el caso de Fusarium oxysporum f. phaseoli, como lo sugiere Christou (15, 16) para F. solani f. phaseoli y para Rhizoctonia solani.

La situación anterior con respecto al tipo de lesión que necesita el hongo para entrar en el hospedero aclara tal vez su denominación como "parásito de heridas" (60) la que es universalmente aplicable si se considera el tipo de herida requerido para la penetración del hongo en la planta hospedera.

No puede descartarse la posibilidad de que se produzca un estímulo por parte de la superficie herida para el desarrollo del hongo previo a la penetración, como se ha observado con F. oxysporum f. cubense en banano. En este caso se le atribuye el efecto a la

glutamina que se forma en las superficies de raíces heridas (60). En la germinación de las clamidósporas de F. solani f. phaseoli se ha comprobado (67) un efecto positivo de productos de descomposición de residuos de la cosecha.

Los resultados obtenidos respecto a la localización del hongo en la planta evidentemente indican que F. oxysporum f. phaseoli causante de la "Fusariosis" del frijol en Costa Rica, es en primer lugar un parásito vascular. Quedó claramente demostrado que el hongo una vez dentro de la planta, se confina al xilema hasta un estado avanzado de la enfermedad. Luego puede pasar a células adyacentes a los vasos. Dentro de los elementos del xilema, el micelio y los conidios tienen cierta movilidad. Pero el abundante desarrollo de hifas en comparación con el número de conidios hace pensar que el micelio es más importante en el avance de la enfermedad. Esto significa que a los conidios no se les puede atribuir tanta importancia en este caso como sucede con F. oxysporum f. cubense, el cual se distribuye en la planta mediante los microconidios (68).

Se sabe que diferentes especies de Fusarium y formas de F. oxysporum pueden extenderse hasta los pecíolos de las hojas. Así lo informan Harter (35) para el F. oxysporum del frijol y Scheffer (59) para el F. oxysporum de tomate. Pero en el presente estudio no fue así, pues el micelio estaba localizado en la raíz, hipocótilo y en la parte baja del tallo (epicótilo), como ya lo había observado Dongo (19). Esto permite afirmar, por lo tanto, que la discoloración y el taponamiento no necesariamente aparecen en las

partes del tejido invadidas por el micelio del hongo, sino se deben a productos de su metabolismo patológico y la influencia se extiende por traslado hasta partes del hospedero más avanzadas donde no llegan micelio y conidios.

Aunque no se comprobó químicamente el porque de la presencia de discoloramiento o marronamiento vascular en el avance del patógeno, se cree que además de sub-productos tóxicos del hongo hay una posible acción enzimática del parásito sobre los elementos del xilema del hospedero tal como se ha sugerido para otras formas de F. exysporum (37, 46). Las toxinas son llevadas en la corriente vascular, tal como se postuló desde hace mucho tiempo (57) y se ha venido discutiendo hasta fecha reciente (19).

Si se presume que esos productos tóxicos estimulan la formación de las sustancias gomosas que causan el taponamiento, habría a mayor desarrollo del hongo una mayor concentración de gemas y por supuesto mayor cantidad de este material en los vasos. Aunque este concepto es aplicable para una sola planta, no existe una correlación directa para plantas de diferentes variedades. Así en plantas tolerantes, a igual nivel de infección, el taponamiento por gemas es mucho menor que en las susceptibles. La mayor concentración de las gemas en la raíz y en la parte baja del tallo con su disminución a mayor altura en la planta, se podría explicar por el hecho de que el estímulo es llevado hacia arriba en la corriente circulatoria. Así su concentración decrecerá por difusión a vasos adyacentes en el transcurso de su traslado.

Los síntomas externos se desarrollan después de los internos,

o sea que estos últimos son primarios en la raíz y secundarios en la parte superior. En el establecimiento de la correlación de síntomas internos y externos de la enfermedad, no se encontró una asociación de los síntomas externos con los cambios anatómicos debidos a la infección fungosa, al estudiar variedades de diferente grado de tolerancia o susceptibilidad. Pero sí hubo diferencia en la intensidad de la reacción citoplasmática del hospedero lo que se manifestó en el marronamiento y taponamiento vascular. Su expresión tomó la siguiente forma: hay enanismo cuando todos los cambios vasculares son leves; el amarillamiento está generalmente asociado con moderadas alteraciones vasculares y marchitamiento con severos cambios en el tejido conductor. Cuando el porcentaje de taponamiento se limita a un 23 o 27%, no alcanza a ser lo suficientemente severo como para perturbar la fisiología normal de la planta. Se notaron efectos solamente cuando el número de vasos inutilizados era de más del 40%. La inutilización puede alcanzar un 80%, pero entonces hay máxima severidad del síntoma manifestado en forma de marchitamiento del vástago y muerte rápida. Al respecto se conoce solamente el reporte de Gottlieb (32) sobre la estimación del porcentaje de vasos taponados en plantas de tomate afectadas por F. bulvigenum var. lycopersici. Este autor encontró en la raíz y parte baja del tallo de plantas marchitas un 50% de los vasos obstruidos. En otros casos (76) el taponamiento se ha estimado simplemente como intenso, medio o bajo.

La medición de los efectos de las oclusiones sobre el flujo de agua a través de la planta, no es suficiente para explicar completa

mente el síndrome de la enfermedad. Probablemente están implicados otros procesos fisiológicos, tales como trastornos del metabolismo de auxinas, lo que ayuda en provocar el enanismo, inhibición de la formación de clorofila, epinastia, etc.

En relación con los aspectos de posibles causas de tolerancia y susceptibilidad de las variedades de frijol al F. oxysporum f. phaseoli, pueden puntualizarse ciertos hechos y hacerse algunas sugerencias para explicarlos, si no hay evidencia de que la tolerancia esté conectada con ninguna alteración de la estructura anatómica o morfológica como respuesta de la planta hospedera al hongo. El hongo crece tanto en los vasos de las plantas tolerantes como en los de las susceptibles, con producción de discoloración o marronamiento en ambos casos y la consecuente oclusión vascular. Parece, sin embargo, que a pesar de la similar apariencia morfológica del micelio éste no puede extenderse tanto en las variedades tolerantes como en las susceptibles.

En otras plantas la resistencia depende de la rápida formación de geles, gomas o tálides, los cuales atrapan las esporas y el micelio, impidiendo su transporte en la planta (8, 9). Esta posibilidad de resistencia, sin embargo, hay que descartarla en el caso de tolerancia de plantas de frijol a F. oxysporum f. phaseoli. Por lo tanto, se puede sugerir que la tolerancia está asociada o depende más bien de la compleja naturaleza fisiológica del citoplasma del hospedero. Su expresión puede manifestarse como inhibición bioquímica del desarrollo del hongo dentro del hospedero o

neutralización de toxinas, bases de resistencia que han sido propuestas por Beckman (9) para el caso de enfermedades del tipo de la "Fusariosis".

Observaciones adicionales indican que hay cierta relación entre las buenas características agronómicas de la planta de frijol tales como precocidad, mayor lignificación del tejido, resistencia a la sequía, buen desarrollo de raíces secundarias y la tolerancia presentada al hongo. Similares observaciones hizo ya Baggett (4) en estudios de resistencia de frijol a F. solani.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir:

1. La penetración del Fusarium oxysporum Schlech f. phaseoli Kendrick y Snyder a plantas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) ocurre por la raíz e hipocótilo, pero requiere de heridas profundas que expongan el tejido vascular.
2. El hongo F. oxysporum f. phaseoli, es un parásito vascular del frijol y en su desarrollo está confinado a los vasos del xilema.
3. La estructura anatómica de la planta hospedera no es afectada por la invasión del hongo.
4. No hay diferencias anatómicas entre variedades tolerantes y susceptibles al hongo, lo cual sugiere que la tolerancia puede atribuirse más bien a factores fisiológicos.
5. No hay formación de tílides como respuesta de la planta al ataque del hongo. El taponamiento ocurre por deposición de geles o gomas en el interior de los vasos.
6. El daño producido en el interior del sistema vascular va más allá de lo que se extiende el micelio.
7. Hay correlación estricta entre síntomas vasculares y foliares: entre más marcado el síntoma interno, es más drástico el síntoma externo. Esto significa que a mayor marronamiento, deposición y extensión de la sustancia que causa el taponamiento de los vasos de las plantas, es mayor la susceptibilidad de éstas.

8. Para el frijol no hay correlación directa entre formación de sustancias gomosas y resistencia al ataque. Al contrario, con mayor deposición de gomas hay mayor intensidad de síntomas debido a deficiencias en el movimiento de la savia bruta.
9. Las plantas tolerantes investigadas presentan características agronómicas deseables, tales como precocidad, resistencia a la sequía, tejidos más lignificados, y, sobre todo, mayor proliferación de raíces laterales.
10. Es probable que por medio de selección y cruzamiento se puedan mejorar las variedades de frijol respecto a su tolerancia a este patógeno.

RESUMEN

Se estudió la penetración, desarrollo de la infección y anatomía patológica del hongo Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick y Snyder, causante de la "Fusariosis" del frijol (Phaseolus vulgaris L.) en plantas de variedades tolerantes y susceptibles al hongo.

Los ensayos de penetración se hicieron en plantas crecidas in vitro y en suelo, utilizando nueve métodos diferentes de inoculación. Para los estudios de la anatomía patológica se utilizaron cortes a mano, en micrótopo de congelación con CO<sub>2</sub> y en micrótopo rotativo, en forma de preparaciones semipermanentes y fijas.

Se encontró que la penetración puede ocurrir a través de la raíz e hipocótilo, pero es necesaria la presencia de heridas que expongan los vasos de xilema; esto rige tanto para las variedades tolerantes como para las susceptibles.

Observaciones microscópicas revelaron que el hongo crece a lo largo de los vasos del xilema. Con el avance de la infección hay discoloración y marronamiento de vasos con subsecuente taponamiento de éstos por material gomoso, depositado dentro del sistema vascular.

Anatómicamente no hubo diferencias entre variedades tolerantes y susceptibles. Respecto a síntomas externos e internos si se observaron diferencias muy marcadas. En variedades que presentan síntomas de enanismo, el marronamiento es poco, con un 43% de los vasos obstruidos; en las de amarillamiento el marronamiento es

intermedio y hay 67% de vasos inutilizados; en las que presentan marchitamiento intenso el marronamiento es muy difundido y el 79% de los vasos muestran taponamiento.

Probablemente la tolerancia no es debida a barreras físicas que impidan el movimiento del hongo dentro del hospedero, sino más bien a mecanismos fisiológicos.

SUMMARY

A study was conducted concerning the penetration, development of infection, and pathological anatomy of the "Fusariosis" disease of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) which is caused by the fungus Fusarium oxysporum Schlecht f. phaseoli Kendrick and Snyder. The study was carried out with varieties of bean susceptible and resistant to the fungus.

The tests of penetration were performed both in vitro and in soil, and utilized nine different methods of inoculation. Tissue sections were used for studies of the pathological anatomy. These were both permanent and semi-permanent. Sectioning was carried out by hand, on a CO<sub>2</sub> freezing microtome, and on a rotary microtome.

It was found that in both the tolerant and susceptible varieties penetration can occur through the root and hypocotyl, but the presence of wounds is necessary to permit penetration into exposed xylem vessels.

Microscopic observations revealed that the fungus grows along the inside of the xylem. Discoloration and browning occurs with the advance of the infection, and there is a subsequent deposition of gummy material which causes plugging of the vascular system.

No anatomic differences could be observed between the tolerant and susceptible varieties. There were, however, apparent differences with respect to both external and internal symptoms. In those susceptible varieties which showed symptoms of stunting, little browning occurred and 43% of the vessels were obstructed.

In those which showed external yellowing, there was internal browning of moderate intensity and 67% of the vessels were seen to be inactivated. The varieties with severe wilting had intense internal browning and 79% of the vessels were plugged.

It was concluded that tolerance is not due to physical barriers which impede growth of the fungus within the host, but rather to some physiological mechanism.

LITERATURA CITADA

1. ANDERSON, M. E. y WALKER, J. C. Histological studies of Wisconsin Hollander and Wisconsin Ballhead cabbage in relation to resistance to yellows. *Journal of Agricultural Research* 50(10):823-836. 1935.
2. ARMSTRONG, G. M. y ARMSTRONG, J. K. Fusarium wilt of bean South Carolina and some host relations of the bean Fusarium. *Plant Disease Reporter* 47(12):1088-1091. 1963.
3. \_\_\_\_\_ y ARMSTRONG, J. K. Pathogenicity of isolates of the bean wilt Fusarium from England and the United States. *Plant Disease Reporter* 48(11):846-847. 1964.
4. BAGGETT, W. A. et al. Test of phaseolus species for resistance to Fusarium root rot. *Plant Disease Reporter* 49(7):630-633. 1965.
5. BAILEY, S. Relationship of Fusarium niveum to the formation of tyloses in melon plants. *Phytopathology* 23(1):33. 1933.
6. BATEMAN, D. F. An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in Rhizoctonia infected hypocotyls of bean. *Phytopathology* 54(4):438-445. 1964.
7. \_\_\_\_\_. Hydrolytic and trans-eliminative degradation of pectic substances by extracellular enzymes of Fusarium solani f. phaseoli. *Phytopathology* 56(2):238-244. 1966.
8. BECKMAN, C. H. y HALMOS, S. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. *Phytopathology* 52(9):893-897. 1962.
9. \_\_\_\_\_ et al. Physical barriers associated with resistance in Fusarium wilt of bananas. *Phytopathology* 51(8):507-515. 1961.
10. \_\_\_\_\_ et al. The interaction of host, pathogen and soil temperature in relation to susceptibility to Fusarium wilt of bananas. *Phytopathology* 52(2):134-140. 1962.
11. BRANDES, E. W. Banana wilt. *Phytopathology* 9(9):339-389. 1919.

12. CARDONA, A. C. Pudriciones fungosas radicales del frijol (Phaseolus vulgaris L.) en el Valle de Medellín, Colombia. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía (Medellín, Colombia) 15(46):137-209. 1954.
13. CHATTWAY, M. M. The development of tyloses and secretion of gum in heartwood formation. Australian Journal of Scientific Research Series B. Biological Sciences 2: 228-240. 1949.
14. CHRISTOU, T. Penetration and host-parasite relationships of Tielaviopsis basicola in the bean plants. Phytopathology 52(3):194-198. 1962.
15. \_\_\_\_\_ Penetration and host-parasite relationships of Rhizoctonia solani in the bean plant. Phytopathology 52(5):381-389. 1962.
16. \_\_\_\_\_ y SNYDER, W. C. Penetration and host-parasite relationships of Fusarium solani f. phaseoli in the bean plant. Phytopathology 52(4):219-226. 1962.
17. DIMOND, A. E. y WAGGONER, P. E. The physiology of lycopersamin production by Fusarium oxysporum f. lycopersici. Phytopathology 43(3):195-199. 1953.
18. \_\_\_\_\_ y WAGGONER, P. E. The cause of epinastic symptoms in Fusarium wilt of tomatoes. Phytopathology 43(12): 633-669. 1953.
19. DONGO DENEGRI, S. L. Estudios sobre la patogenicidad de Fusarium oxysporum f. phaseoli en el frijol. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1967. 46 p. (Mimeografiada).
20. ECHANDI, E. Amarillamiento del frijol (Phaseolus vulgaris L.) provocado por Fusarium oxysporum f. phaseoli. Turrialba (Costa Rica) 17(4):409-410. 1967.
21. EDGINGTON, M. E. y DIMOND, A. E. The role of pectic substances in chemically induced resistance to Fusarium wilt of tomato. Phytopathology 51(3):179-182. 1961.
22. ESAU, K. Phloem structure in the grapevine and its seasonal changes. Hilgardia 18(5):217-296. 1948.
23. \_\_\_\_\_. Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony peach. Hilgardia 18(12):423-482. 1948.
24. \_\_\_\_\_. Plant anatomy. New York, John Wiley, 1953. 735 p.

25. ETTEN, H. D. VAN, MAXWELL, D. P. y BATEMAN, D. F. Lesion maturation, fungal development, and distribution of endopolygalacturonase y celulase in Rhizoctonia infected bean hypocotyl tissues. *Phytopathology* 57(2):121-126. 1967.
26. FRENCH, E. R. y KENNEDY, B. W. The role of Fusarium in the root rot complex of soybean in Minnesota. *Plant Disease Reporter* 47(7):672-676. 1963.
27. GÄUMANN, E. Some problems of pathological wilting in plants. *Advances in Enzymology* 11:401-431. 1951.
28. \_\_\_\_\_. Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology* 47(6):342-357. 1957.
29. GERRY, E. Tyloses: their occurrence and practical significance in some American woods. *Journal of Agricultural Research* 1(6):445-470. 1914.
30. GOTOSKAR, R. P. et al. The role of pectic enzymes in Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 43(11):535-536. 1953.
31. \_\_\_\_\_ et al. The role of enzymes in the development of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 45(9):381-387. 1955.
32. GOTTLIEB, D. The mechanism of wilting caused by Fusarium bulvigenum var. lycopersici. *Phytopathology* 34(1):41-59. 1944.
33. GRAY, P. Handbook of basic microtechnique. New York, Blakiston, 1922. 141 p.
34. \_\_\_\_\_. The microtome's formulary and guide. London, Constable, 1954. 794 p.
35. HARTER, L. L. A Fusarium disease of beans. *Phytopathology* 19(1):84. 1929.
36. HENRIETTA, L. CH. y CORDEN, M. E. Semeiography of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 53(9):1006-1010. 1963.
37. HURSH, C. R. The reactions of plants stems to fungus products. *Phytopathology* 18(7):603-610. 1928.
38. JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill, 1940. 523 p.

39. JONES, J. P. y WOLTZ, S. S. Fusarium wilt (race 2) of tomato: Effect of lime and micronutrient soil amendments on disease development. *Plant Disease Reporter* 51(8): 645-648. 1967.
40. KENDRICK, J. B. y SNYDER, W. C. Fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 32(11):1010-1014. 1942.
- ✓ 41. LANUZA, J. M. Nutrición hidropónica con microelementos. I. Manganeso, Boro, Molibdeno en Pinus radiata. Madrid, Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, 1966. 399 p.
42. LINDFORD, M. B. Studies of pathogenesis and resistance in pea wilt caused by Fusarium orthoceras var. psi. *Phytopathology* 21(7):797-826. 1931.
43. \_\_\_\_\_. Transpirational history as a key to the nature of wilting in the Fusarium wilt of peas. *Phytopathology* 21(8):791-796. 1931.
44. LITRELL, R. H. Effects of nitrogen nutrition on susceptibility of chrysanthemum to an apparently new biotype of Fusarium oxysporum. *Plant Disease Reporter* 50(11):882-884. 1966.
45. MARTHUR, R. S. et al. Sporulation in relation to resistance in the Fusarium wilt of peas. *Phytopathology* 21(7): 827-833. 1937.
46. MCCLURE, T. T. Anatomical aspects of the Fusarium wilt of sweet potatoes. *Phytopathology* 40(8):769-775. 1950.
47. MCONIE, K. C. Germination and infection of citrus by ascospores of Guignardia citricarpa in relación to control of black spot. *Phytopathology* 57(7):743-746. 1967.
48. MELENDEZ, P. L. y POWELL, N. T. Histological aspects of the Fusarium wilt root knot complex in blue-cured tobacco. *Phytopathology* 57(3):286-292. 1967.
49. MEYER, J. A., GARBER, E. D. y SHAFFER, S. Genetic of phytopathogenic fungi. XII. Detection of esterasas and phosphatases in culture filtrates of Fusarium oxysporum and F. xylarioides by starch-gel zone electroforesis. *Botanical Gazette* 125(4):298-300. 1964.
50. PAGE, O. T. Observations on the water economy of Fusarium infected banana plants. *Phytopathology* 49(2):61-65. 1959.

51. PAGE, O. T. Fusaric acid in banana plants infected with Fusarium oxysporum f. cubense. *Phytopathology* 49(4):230. 1959.
52. \_\_\_\_\_. Quantitative paper chromatographic techniques for polygalacturonase activity of fungus cultures. *Phytopathology* 51(5):337-338. 1961.
53. \_\_\_\_\_. The physiology of lycopersin production by Fusarium oxysporum f. cubense. *Phytopathology* 51(8):578. 1961.
54. PARK, D. Morphogenesis, fungistasis, and cultural staling in Fusarium Oxysporum Snyder & Hansen. *Transactions British Mycological Society* 44(3):377-390. 1961.
55. \_\_\_\_\_. Some properties of a staling substance from Fusarium oxysporum. *Transactions British Mycological Society* 47(4):541-546. 1964.
56. PIERSON, C. F. et al. Histological studies on role of pectic enzymes in development of Fusarium wilt symptoms in tomato. *Phytopathology* 45(10):524-527. 1955.
57. ROSEN, H. R. Efforts to determine the means by which the cotton-wilt fungus, Fusarium vasinfectum induces wilting. *Journal of Agricultural Research* 33(10):1143-1162. 1926.
58. SASS, J. E. Botanical microtechnique. 3rd. ed. Ames, Iowa State College Press, 1958. 228 p.
59. SCHEFFER, R. P. y WALKER, J. C. The physiology of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 43(2):116-125. 1951.
60. SEQUEIRA, L. et al. Role of root injury in Panama disease infections. *Nature* 182(463):309-311. 1958.
61. SHAW-MING, Y. y HGEDORN, D. J. Root rot of processing bean in Wisconsin. *Plant Disease Reporter* 50(8):578-580. 1966.
62. SILVA, M. DE. Basic fuchsin-tanic acid a one solution stain for spore walls. *Stain Technology* 40(5):253-256. 1965.
63. SMITH, R. y WALKER, J. C. A cytological study of cabbage plants in strains susceptible or resistant to yellows. *Journal of Agricultural Research* 41(1):17-35. 1930.
64. STOVER, R. H. y WAITE, B. H. Colonization of banana roots by Fusarium oxysporum f. cubense and other soil fungi. *Phytopathology* 44(12):689-693. 1950.

65. STRUCKMEYER, E. et al. Plugging of vessels by tyloses and gums in wilting oaks. *Phytopathology* 44(2):148-153. 1954.
66. TAYLOR, G. S. y PARQUINSON, D. Studies on fungi in the root region. IV. Fungi associated with the root of Phaseolus vulgaris L. *Plant and Soil* 22(1):1-20. 1965.
67. TOUSSOUN, T. A. et al. Influence of crop residue decomposition products on the germination of Fusarium solani f. phaseoli chlamydospores in soil. *Nature* 197(4874):1314-1316. 1963.
68. TRUJILLO, E. E. Pathological-anatomical studies of Gros Michel banana affected by Fusarium wilt. *Phytopathology* 53(2):162-166. 1963.
69. ULLSTRUP, A. J. Histological studies on wilt of China Aster. *Phytopathology* 27(8):737-748. 1937.
70. VAGAS, E. y MAACZ, G. J. A quick method for staining the hyphae of Ustilago maydis. *Stain Technology* 35(4):220-222. 1960.
71. WAGGONER, P. E. y DIMOND, A. E. Production and role of extracellular pectic enzymes of Fusarium oxysporum f. lycopersici. *Phytopathology* 45(1):79-87. 1955.
72. WALKER, J. C. y FOSTER, R. E. Plant nutrition in relation to disease development. III. Fusarium wilt of tomato. *American Journal of Botany* 33(4):259-264. 1946.
73. WARDLAW, C. W. The biology of banana wilt (Panama disease). II. Preliminary observations on sucker infection. *Annals of Botany* 44(4):917-956. 1930.
74. \_\_\_\_\_. Banana diseases; including plantains and abaca. New York, John Wiley, 1961. 648 p.
75. WELLS, D. G. et al. Evaluation of resistance and susceptibility in garden pea to near-wilt in the greenhouse. *Phytopathology* 39(10):771-779. 1949.
76. WINSTEAD, N. N. y WALKER, H. C. Production of vascular browning by metabolites from several pathogens. *Phytopathology* 44(3):153-158. 1954.

77. WOLLEY, D. W. Strepogenin activity of derivatives of glutamic acid. *Journal of Biological Chemistry* 172(1):71-81. 1948.
78. ZAUMEYER, W. J. y THOMAS, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. U. S. Department of Agriculture. Technical Bulletin 868. 1957. 255 p.